

**Untersuchung eines FRET-Systems zur Darstellung von  
Entzündungsprozessen in vitro und in vivo mittels  
molekularer Bildgebung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von

Tom Schröter

Geboren am 30.03.1984 in Gera

Die vorliegende Arbeit wurde in der AG Experimentelle Radiologie am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Jena, Forschungszentrum Jena Lobeda (FZL), angefertigt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. I. Hilger
2. Prof. Dr. D. Gottschild
3. Prof. Dr. D. Fischer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.01.2012

## Abkürzungsverzeichnis

### Einheiten

%	Prozent
a.u.	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
°C	Grad Celsius
d	Tage
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunden
J	Jahre
l	Liter
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
M	Molar
min	Minuten
mol	Mol
rpm	rotations per minute
s	Sekunden
Sv	Sievert

### Einheitenvorsätze

k	Kilo
c	Centi
m	Milli
μ	Mykro
n	Nano

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

## Formelzeichen

a	Anstieg
A	Absorption
c	Konzentration
CF	Corection Factor
d	Schichtdicke
$\epsilon$	dekadischer molarer Extinktionskoeffizient
m	Masse
M	Molare Masse
n	Stoffmenge
s	Schnittpunkt mit der y-Achse
V	Volumen

## Substanzen

5-LO	5-Lipoxygenase
A. dest.	Destilliertes Wasser
AP-1	Aktivator Protein 1
CFP	Cyanes Fluoreszenzprotein
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FcR	Fc-Rezeptor
FKS	fetales Kälberserum
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
Hanks BSS	Hanks Balanced Salt Solution
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie induzierter Faktor 1 $\alpha$
HCl	Salzsäure
I- $\kappa$ B	Inhibitor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Inhibitor "kappa-leichte-Ketten-Verstärker" von aktivierten B-Zellen)



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LPS	Lipopolisaccharide
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (Makrophagen Entzündungsprotein 1 $\alpha$ )
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MMP	Martix Metalloprotease
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (nukleärer Faktor “kappa-leichte-Ketten-Verstärker” von aktivierten B-Zellen)
NHS	N-Hydroxysuccimid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphat Buffered Saline
PGE	Prostaglandin E
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPD	Paraphenylendiamin
RNA	Ribonukleinsäure
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription (Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription)
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrose Faktor
tPA	Gewebe-Plasminogenaktivator
YFP	Gelbes Fluoreszenzprotein

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

### Sonstiges

A	Akzeptor
AG	Arbeitsgemeinschaft
AUC	Fläche unter der Kurve
CLSM	Confokales Laserscanning Mikroskop
CT	Computertomograph
D	Donor
DY	Dynamics
Em	Emissionsfilter
Eo	Eosinophile Granulozyten
Ex	Excitationsfilter
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
FS	Farbstoff
i.v.	intra venös
KG	Körpergewicht
LM	Lösungsmittel
MØ	Makrophagen / Monozyten
Mc	Mastzellen
MDSC	Myeloidabstammende Supressorzellen
NIR	Nahinfrarot
NIRF	Nahinfrarot Farbstoffe
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
ROI	Region of interest
s.c.	sub cutan
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
TM	Trademark (Verkaufsmarke)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Die Entzündungsreaktion.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>Molekulare Bildgebung als Diagnose-Vorsprung .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.</b>	<b>Darstellung von Protein-Interaktionen mittels FRET.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.</b>	<b>Zielstellung.....</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>SUBSTANZEN, GERÄTE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.</b>	<b>Substanzen .....</b>	<b>13</b>
3.1.1.	Beschreibung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe .....	13
3.1.2.	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen .....	17
3.1.3.	Sonstige Substanzen.....	18
<b>3.2.</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>19</b>
3.2.1.	Maestro <sup>TM</sup> In-Vivo Fluorescence Imaging System.....	19
3.2.2.	Sonstige Geräte .....	22
<b>3.3.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>23</b>
3.3.1.	Charakterisierung der Zelllinie J774.....	23
3.3.2.	Charakterisierung der verwendeten Mäuse .....	24
3.3.3.	Sonstige Materialien .....	25
<b>3.4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.4.1.	Herstellung der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe .....	27
3.4.1.1.	Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an unspezifische IgG-Moleküle .....	27
3.4.1.2.	Gelpermeationschromatographie .....	28
3.4.1.3.	Aufkonzentration der Eluate .....	31
3.4.1.4.	Analytik der Eluate.....	32
3.4.2.	Untersuchung von FRET- und Quenching-Effekten der Sonden .....	34

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.4.2.1.	Nachweis von FRET nach Fixierung der Sonden auf Nitrozellulosemembran .....	34
3.4.2.2.	Parallele Darstellung von IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff .....	35
3.4.2.3.	Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe in bestimmten Konzentrationsbereichen .....	36
3.4.2.4.	Bedienung des Maestro <sup>TM</sup> -Kleintierimagers .....	37
3.4.3.	Allgemeiner Umgang mit Zellen der J774-Reihe .....	41
3.4.3.1.	Auftauen der Zellen .....	41
3.4.3.2.	Mediumwechsel .....	41
3.4.3.3.	Passagieren .....	42
3.4.4.	Zellversuche .....	44
3.4.4.1.	Internalisierungsversuche mit Zellkulturflaschen .....	44
3.4.4.2.	CLSM-Vermessung der Makrophagen .....	46
3.4.5.	Tierversuche .....	48
3.4.5.1.	Untersuchung von Fluoreszenz und FRET nach s.c. Applikation von inkubierten Zellen .....	48
3.4.5.2.	Untersuchung von FRET am Ödemmodell .....	49
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.</b>	<b>FRET-Eigenschaften der Sonden .....</b>	<b>52</b>
4.1.1.	Gegenüberstellung des FRET-Paares und Kontroll-Paares auf einer Nitrozellulosemembran .....	52
4.1.2.	Vergleich der Signalintensität zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff .....	56
4.1.3.	Untersuchung des Quenching-Effektes und der Detektionsgrenze .....	59
<b>4.2.</b>	<b>In vitro Nachweis der FRET-Sonden .....</b>	<b>61</b>
4.2.1.	Nachweis der Fluoreszenz in Zellpellets .....	61
4.2.1.1.	Für den freien Fluoreszenzfarbstoff .....	61
4.2.1.2.	Für den IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff .....	64
4.2.2.	Nachweis der Internalisierung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 durch Makrophagen .....	67

<b>4.3.</b>	<b>Tierversuche mit lokaler Applikation Farbstoff inkubierter Makrophagen</b> .....	<b>68</b>
<b>4.4.</b>	<b>In vivo Nachweis von FRET nach systemischer Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe.....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
<b>5.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....</b>	<b>108</b>

## 1. Zusammenfassung

Bei der Darstellung von verschiedensten Erkrankungen auf molekularer Ebene wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Die Aufmerksamkeit beschränkt sich hierbei jedoch bisher auf die Darstellung meist nur eines Moleküls. Zur Darstellung von Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen eignet sich vor allem der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) beschrieben von Th. Förster (Förster 1948).

In dieser Arbeit wurde ein von Toni Luge (Luge 2009) definiertes FRET/Kontroll-Paar-System bestehend aus verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (FRET-Paar: DY-682/DY-782; Kontroll-Paar: DY-505/DY-782) weiter entwickelt und charakterisiert. Dazu wurden die von Luge für die Paare beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffe an unspezifisches Immunglobulin G gekoppelt und diese auf ihre Anwendbarkeit in biologischen Systemen hin untersucht. Es zeigte sich dabei, dass die zuvor erfolgreich auf Nitrozellulosemembran beobachtet und beschriebenen Effekte auch in vitro und in vivo reproduziert werden können.

Dieser FRET-Effekt wurde dabei in den mit Makrophagen der Zelllinie J774 durchgeführten in vitro Experimenten gefunden. Sowohl die einzelnen Floreszenzen der Farbstoffe als auch die für FRET typischen Änderungen der Fluoreszenzintensitäten konnten ebenso wie die Internalisierung der Sonden durch die zur Phagozytose befähigten Zellen mittels CLSM-Vermessung nachgewiesen werden.

In der nun nachfolgenden ersten Stufe der in vivo Experimenten konnte gezeigt werden das die Fluoreszenzfarbstoffe und der FRET-Effekt durch die Haut der Versuchstiere hindurch nachweisbar bleiben. Die hierfür subcutan applizierten Zellpellets aus zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffsonden behandelten Makrophagen waren deutlich mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager zu identifizieren. Ebenfalls konnten die für FRET spezifischen Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten hier gefunden werden. In der zweiten Stufe der in vivo Experimente konnten Fluoreszenz und FRET-Effekt in einem vorher induzierten Entzündungsgebiet nach intravenöser Gabe der Fluoreszenzfarbstoffsonden eindeutig nachgewiesen werden.

Möglich war somit also nicht nur die Darstellung von FRET durch die Haut der Tiere hindurch, sondern es gelang auch mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffsonden der Nachweis eines lokalisierten Entzündungsareals. Der Autor geht dabei aufgrund der Ergebnisse der in vitro Experimente davon aus, dass die Fluoreszenzfarbstoffsonden nach intravenöser Gabe in die Schwanzvene der Versuchstiere im Blutstrom von zur Phagozytose befähigten Zellen

aufgenommen wurden und diese Zellen der Immunabwehr anschließend fluoreszenzfarbstoffbeladen in das Entzündungsgebiet einwanderten.

Auf diese Weise könnte später durch Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an für besondere Entzündungsmarker und –enzyme spezifische Antikörper klinisch der Nachweis von Entzündungen bereits vor der morphologischen Veränderung der Organe erfolgen.

Das potentielle Anwendungsgebiet dieses Systems beschränkt sich allerdings nicht nur auf das Gebiet der Entzündungsdiagnostik. Durch seine Vielseitigkeit im Hinblick auf die Kopplung an spezifische Antikörper könnte es klinisch auch Anwendung in Bereichen der Tumordiagnostik und Metastasenerkennung finden. Auf Grund der Verwendung von bestimmten Wellenlängen des Lichtes bei der Anwendung könnte die Strahlenbelastung von Patienten wie sie bei aktuellen bildgebenden Verfahren wie CT, SPECT und PET auftritt, minimiert werden. Des Weiteren würde sich durch den Nachweis der Entzündung bereits vor morphologischen Veränderungen an Zellen, Geweben und Organen ein deutlicher zeitlicher Diagnosevorsprung ergeben.

Aber auch die Anwendung im experimentellen Bereich ist mit diesem System möglich. Durch die Nachweisbarkeit von direkten Interaktionen verschiedener Moleküle durch den FRET-Effekt, welcher nur bei enger räumlicher Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe auftritt, könnten Protein-Protein-Interaktionen sichtbar gemacht werden. Dies könnte für das Verständnis verschiedenster Prozesse von entscheidendem Vorteil sein. Besonders die nachgewiesene Anwendbarkeit des Systems in lebenden Organismen und Zellen stellt dabei einen interessanten Gesichtspunkt dar.

Zur genaueren Charakterisierung des entwickelten Systems sind selbstverständlich noch weiterführende Experimente erforderlich.

Es steht hiermit ein Tool zur Verfügung, welches sich durch seine große Vielseitigkeit, seine Anwendbarkeit in lebenden biologischen Systemen und seine Fähigkeit zur Darstellung von Interaktionen verschiedenster Moleküle auszeichnet.

## 2. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Darstellung von entzündlichen Prozessen mittels molekularer Bildgebung und FRET (Fluoreszenz Resonance Energie Transfer) sowie in vitro als auch in vivo.

### 2.1. Die Entzündungsreaktion

Unter einer Entzündungsreaktion versteht man eine lokale Reaktion des Körpers auf einen schädlichen Reiz. Dieser Reiz kann sowohl exogene Ursachen wie Toxine, Mikroorganismen, Fremdkörper oder physikalische Gewebsschädigungen (extreme Hitze, Kälte, Strahlung), als auch endogene Ursachen wie Autoimmunerkrankungen umfassen. Dabei kommt es meist zur Ausbildung der fünf klassischen Entzündungszeichen: calor (Überwärmung), rubor (Rötung), dolor (Schmerz), tumor (Schwellung) und functio laesa (eingeschränkte Funktion). Jedoch müssen nicht immer alle diese Zeichen während einer Entzündung auftreten.

Das Ziel einer Entzündungsreaktion ist, durch Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr und Inaktivierung des schädigenden Agens die Ursache zu bekämpfen und die Heilung zu fördern. Unter bestimmten Umständen kann sich eine solche Entzündungsreaktion jedoch verselbstständigen und chronifizieren. Daraus folgt statt einer positiven protektiven eine den Körper dauerhaft schädigende Wirkung der Entzündung. Manche Erkrankungen führen auch zu einer überschießenden Reaktion des Körpers. Manchmal kommt es auch zu einer Reaktion auf eigentlich nicht schädliche Reize oder körpereigene Substanzen. Besonders Entzündungsreaktionen, welche sich gegen den Körper selbst richten, auch autoimmune Entzündungsreaktionen genannt, können den Körper empfindlich schädigen. Wichtige Vertreter dieser Art von Entzündung sind Erkrankungen wie Morbus Chron (Inzidenz: 5/100.000/J), Colitis ulcerosa (Inzidenz: 4/100.000/J (Herold 2009)), Multiple Sklerose und die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie die rheumatoide Arthritis (Prävalenz: 1% bei Erw., im Alter > 55 J. 2% (Herold 2009)). Auch besteht eine enge Verbindung zwischen Tumorgenese und Entzündungen. Bereits Virchow hatte 1863 seine Hypothese über Tumorentstehung auf der Basis von Entzündungsreaktionen formuliert. Heute ist der Zusammenhang zwischen Tumoren und Entzündungen weithin akzeptiert (Coussens und Werb 2002).



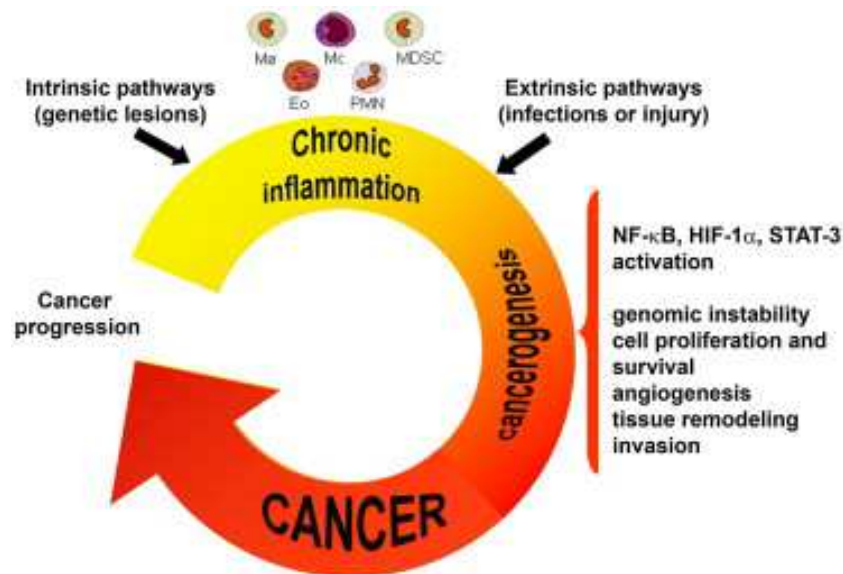


Abbildung 1: Verbindung von Krebs und Entzündung. Ungeachtet vom Trigger führen sowohl intrinsische (durch genetische Alterung) und extrinsische (durch Entzündungszellen und Mediatoren) Wege zur Ausbildung von Entzündungen und Neoplasien. Neoplasitische Zellen und Leukozyten, die hauptsächlich zur myelomonozythären Reihe gehören, tragen beide zu schwelenden Entzündungen bei, welche mit der Entstehung und dem Vorschreiten von Tumoren assoziiert werden. Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  und STAT-3 sind Schlüsselmodulatoren der Entzündungsreaktion, welche Krebsentstehung auf verschiedensten Wegen, wie Induktion genetischer Instabilität, erhöhte Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose, Induktion von Tumorangiogenese und Gewebs-Remodeling, begünstigt. (M $\phi$  - Makrophagen; Mc - Mastzellen; MDSC – Myeloid-abstammende Suppressorzellen; Eo - Eosinophile; PMN – Polymorphonucleäre Zellen). (Porta 2009)

Der klare Zusammenhang ist zum Beispiel zwischen der chronischen Entzündung bei einer Barrett Ösophagitis und dem Auftreten des Ösophaguscarzinoms deutlich erkannt. Bisher ist jedoch noch nicht letztendlich geklärt, welche zellulären und molekularen Prozesse genau zu einer solchen Entartung des entzündlichen Gewebes führen. Offenbar generiert beispielsweise die Barrett Ösophagitis eine Umgebung, welche DNA- Schädigungen begünstigt und die Expression von Genen, welche für Proliferation und Apoptose verantwortlich sind, verändert (Abdel-Latif 2009). In mit „Knock-Out-Mäusen“ (Mäuse bei denen absichtlich ein bestimmtes Gen für die Produktion einer wichtigen körpereigenen Substanz ausgeschaltet wurde) durchgeführten Experimenten wurde festgestellt, dass Mäuse, bei denen die Cyclooxygenase 2, ein Enzym welches Arachidonsäure in Prostaglandine umwandelt und somit entscheidend an den meisten Entzündungsreaktionen beteiligt ist, fehlte, eine verstärkte Resistenz gegen Darm-, Haut- und Brustkrebs aufwiesen (Porta 2009).

Der geordnete Ablauf einer Entzündungsreaktion erfordert jedoch das komplexe Zusammenspiel vieler verschiedener Instanzen im Körper. Aktivierung und Deaktivierung der

Entzündungsreaktion stehen dabei in einem empfindlichen Gleichgewicht. Alle Prozesse, welche für eine geordnete Entzündungsreaktion nötig sind, sind bis heute noch nicht bekannt. Soehnlein und Lindbom gliedern den Ablauf einer Entzündungsreaktion in verschiedene Phasen (Soehnlein und Lindbom 2010). Nachdem es zu einer Schädigung des Gewebes gekommen ist, beginnen Gewebsmakrophagen und Monozyten aus dem Blut, welche die Endothelwand entlang wandern und diese kontrollieren, mit der Produktion von Chemokinen und Cytokinen. Dadurch wird das Immunsystem alarmiert und neutrophile Granulozyten rekrutiert. In Phase 2 wandern die durch die produzierten Chemokine und Cytokine angelockten neutrophilen Granulozyten ins Entzündungsgebiet ein und entleeren hier ihre Granula. Die in den Granula enthaltenen Stoffe und Mediatoren fördern die Migration von Monozyten aus dem Blutkreislauf ins entzündete Gewebe. Phase 3 ist dadurch gekennzeichnet, dass die neutrophilen Granulozyten beginnen abzusterben. Sie haben nur eine geringe Lebensspanne, welche durch pro- und antiinflammatorische Signale beeinflusst wird. Diese Signale stammen zu großen Teilen von Makrophagen. Bei einer Entzündungsreaktion kommt es sehr schnell zum Absterben großer Zahlen von neutrophilen Granulozyten. Dabei geben sie noch Stoffe ab, welche ein „Find me“-Signal an Fresszellen aussendet. Es werden dadurch vor allem weitere Makrophagen und Monozyten angelockt. Die apoptotischen neutrophilen Granulozyten produzieren außerdem Signalstoffe, welche die weitere Einwanderung anderer neutrophiler Granulozyten verhindern. In der letzten Phase (Phase 4) beginnen die angelockten Makrophagen die abgestorbenen neutrophilen Granulozyten zu phagozytieren. Damit wird in ihnen ein Prozess ausgelöst, durch welchen sie beginnen Mediatoren freizusetzen, welche wiederum die Heilung des Endothels und die Wiederherstellung der Homeostase des Gewebes fördern.

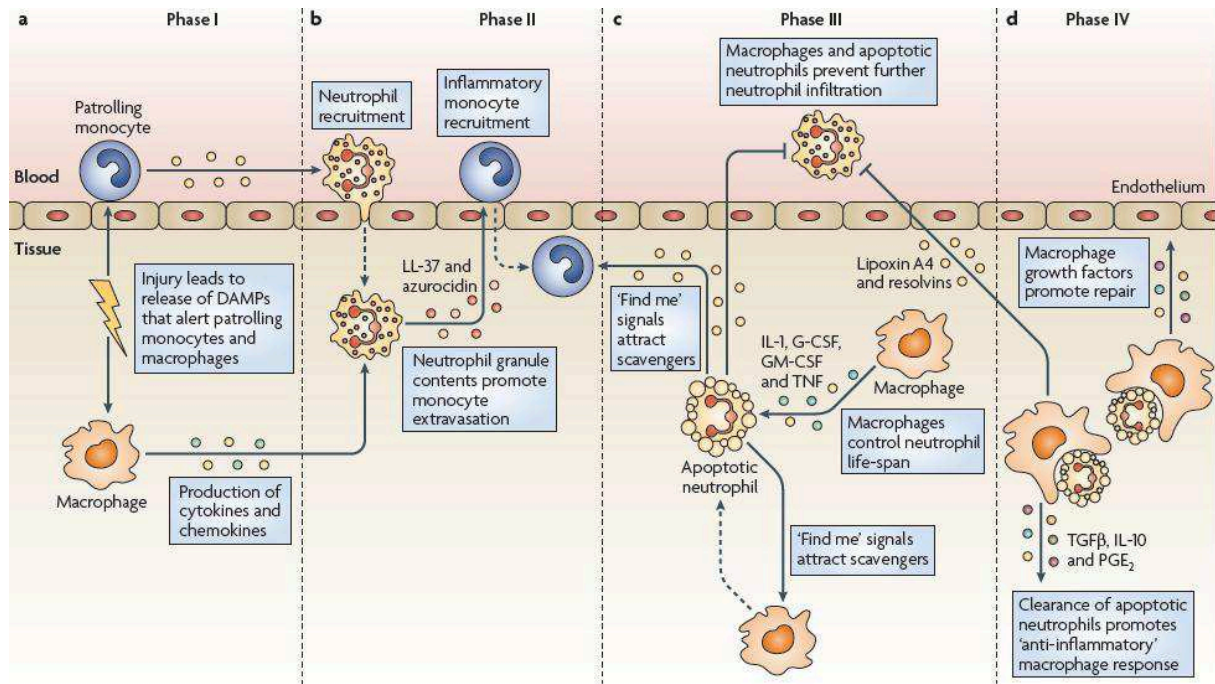


Abbildung 2: Phagozyteninteraktion während einer Entzündung. a) Phase I: patrollierende nicht-klassische Monozyten und ortsansässige Makrophagen sind die ersten Zellen, welche eine Störung der Gewebshomeostase feststellen. Sie beginnen innerhalb kürzester Zeit mit der Produktion von Cytokinen und Chemokinen um das Immunsystem zu alarmieren und Neutrophile zu rekrutieren. b) Phase II: Kurz nachdem der Alarm abgegeben wurde, wandern Neutrophile in das geschädigte Gewebe ein und geben den Inhalt ihrer Granula frei, welcher die Auswanderung von Monozyten aus dem Blutkreislauf fördern. c) Phase III: Die Lebensspanne der eingewanderten Neutrophilen ist sehr kurz und abhängig von pro- und anti-entzündlichen Signalen von denen einige von Makrophagen produziert werden. Makrophagen und apoptotische Neutrophile verhindern die weitere Einwanderung von Neutrophilen. Das Signal der apoptotischen Neutrophilen bewirkt jedoch einen weiteren Zustrom von Monozyten. d) Phase IV: Die Beseitigung apoptotischer Neutrophiler fördert ein Anti-Entzündliches Programm in Makrophagen. Dies führt zur Rekonstruktion der Gewebshomeostase. G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF - granulocyte–monocyte colony-stimulating factor; IL - Interleukin; PGE<sub>2</sub> - Prostaglandin E<sub>2</sub>; TGFβ - transforming growth factor-β; TNF - tumour necrosis factor. (Soehnlein und Lindbom 2010)

### 2.2. Molekulare Bildgebung als Diagnose-Vorsprung

Die im Moment eingesetzten bildgebenden Verfahren wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) können entzündliche Prozesse im menschlichen Körper erst sichtbar machen, wenn sie zu morphologischen Veränderungen geführt haben. Bereits vor der morphologischen Veränderung an Geweben und Organen kommt es allerdings bereits zu Reaktionen auf molekularer Ebene. Dabei laufen im Körper Prozesse auf RNA- und Proteinebene ab. Es kommt zu, für Entzündungen spezifischen, Interaktionen. Obwohl Entzündungen durch wichtige spezifische Enzyme schon vorher mittels Labordiagnostik erkannt werden können, kann auf diese Weise die Lokalisation und Ausdehnung der Entzündung nicht festgestellt werden. Mittels der molekularen Bildgebung ist es möglich, die oben genannten Protein-Interaktionen sichtbar zu machen. Dies kann direkt an dem Ort, an welchem sie stattfinden geschehen. Somit könnte mittels geeigneter Sonden die Entzündung bereits in diesem Stadium erkannt und lokalisiert werden. Es ergibt sich dadurch ein gewaltiger Vorteil gegenüber der aktuellen Diagnostik. Auf diese Weise könnte die Therapie bereits vor den teilweise irreversiblen Veränderungen der Organstrukturen beginnen.

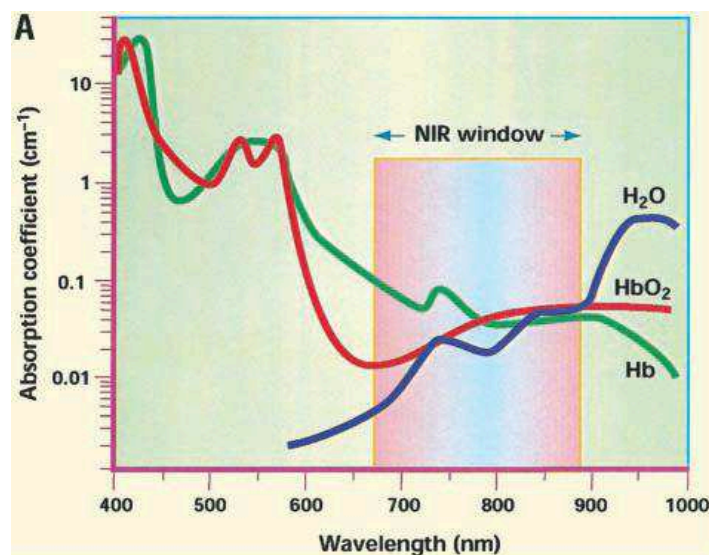


Abbildung 3: Diagramm über die Absorption von Hb, HbO<sub>2</sub> und Wasser bei verschiedenen Wellenlängen des Lichtes mit Darstellung des „NIR window“ (Mahmood und Weissleder 2003)

Ein solches Kontrastmittel muss aus einem die nachzuweisende Struktur oder das Protein spezifisch bindenden Part (z.B.: einem spezifischen Antikörper) und einem bildgebenden Part bestehen. Besonders interessant sind hierbei Fluorophore des Nahinfrarot-Bereiches (600 – 800 nm). In diesem Bereich ist die Autofluoreszenz durch Hämoglobin und Wasser geringer als in anderen Wellenbereichen (siehe Abbildung 3) und das Licht kann somit einige Zentimeter tief in das Gewebe eindringen (Mahmood und Weissleder 2003).

Die hier beschriebenen Vorteile der Nahinfrarotfluoreszenz-Farbstoffe (kurz NIRF-Farbstoffe) wurden bereits in einigen Arbeiten genutzt um verschiedene Entzündungssituationen darzustellen. So beschrieben J. Klohs et al. die Darstellung des Entzündungsrezeptors CD40 in Mäusen nach fokale zerebraler Ischämie. Dabei wurde von ihnen ein mit einem NIRF-Farbstoff gekoppelter Antikörper für diesen Rezeptor verwendet (Kohs 2008). Auch Eisenblätter et al. verwendeten zur Darstellung einer mittels eines cutanen Granulom-Modells hervorgerufenen Entzündung NIRF-Farbstoffe. Diese wurden verwendet um damit Makrophagen und Monozyten zu markieren, welche in die Entzündung einwanderten (Eisenblätter 2009). Ebenfalls verwendeten auch A. Hansch et al. NIRF-Farbstoffe in einem Antigen-induzierten Arthritis-Modell (Hansch et al. 2004). In all diesen Arbeiten wurden jedoch nur einzelne Targets mittels der NIRF-Farbstoffe nachgewiesen. Da eine Entzündungsreaktion, wie bereits beschrieben, jedoch aus einer komplexen Verschaltung multipler Prozesse und Substanzen besteht, wäre die Darstellung der Interaktion mehrerer Targets ein deutlicher Vorteil und würde dem eigentlichen Prozess der Entzündung sehr viel näher kommen.

FRET ermöglicht diese Darstellung von Protein-Interaktionen und kann somit einen Einblick in die bei einer Entzündung ablaufenden Prozesse geben.

Die Darstellung von FRET soll in dieser Arbeit in einem Ohr-Ödem-Modell erreicht werden. Dieses Ohr-Ödem soll mittels einer 1%igen Zymosan-A-Lösung hervorgerufen werden. Sowohl die Induktion eines Ödems am Ohr als auch die Verwendung von Zymosan zur Erzeugung eines Entzündungsmodelles ist in der Literatur weit verbreitet. So wird Zymosan sowohl bei Satoshi Yamamoto et al. als auch bei Navin L. Rao et al. zur Induktion einer Peritonitis verwendet (Yamamoto et al. 2006) (Rao 2007). Sun Phil Choi et al. verwenden tPA zur Induktion einer Entzündung am Ohr (Choi 2010) und Ilona Kurnatowska und Marek Pawlikowski beschreiben die Induktion eines Ohrödems mittels Zymosans (Kurnatowska und Pawlikowski 2001). In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Ohrödem gewählt um eine begrenzte lokale Entzündung hervorzurufen. Außerdem bietet das Ohrödem die Möglichkeit alle Veränderungen direkt mit dem unbehandelten Ohr der Maus zu vergleichen.

### 2.3. Darstellung von Protein-Interaktionen mittels FRET

Fluoreszenz entsteht, wenn ein Fluorophor ein Photon absorbiert. Dabei wird ein Elektron vorübergehend auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn es von diesem höheren Niveau wieder auf sein ursprüngliches Energieniveau zurückfällt, gibt es Energie ab. Diese Energie kann das Fluorophor in Form von Photonen aussenden, wodurch ein Leuchteffekt entsteht. Das Fluorophor kann die Energie jedoch auch an ein anderes Molekül in seiner Nähe abgeben. Hierbei wird kein Photon freigesetzt, sondern die Energie mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkungen an das andere Molekül abgegeben (Lakowicz 1999). Einen solchen Energietransfer nennt man Förster-Resonanz-Energie-Transfer. Er wurde erstmals von Th. Förster 1948 quantitativ beschrieben (Förster 1948). Wird die Energie dabei von einem Fluorophor auf ein anderes Fluorophor übertragen spricht man vom Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Damit eine solche Energieübertragung möglich wird, müssen jedoch bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein.

Eine Voraussetzung dafür ist, dass das Absorptionsspektrum des zweiten Fluorophores, auch Akzeptor genannt, das Emissionsspektrum des ersten Fluorophores, auch Donor genannt, überschneidet (*siehe 2.1.1. Beschreibung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe*).

Des Weiteren müssen sich die beiden Fluorophore in einer engen räumlichen Nähe zueinander befinden. Der für einen solchen Energietransfer benötigte Abstand zwischen zwei Molekülen wird auch als Förster-Radius bezeichnet (Förster 1948).

Die vom zweiten Fluorophor auf diese Weise aufgenommene Energie kann dieses nun in Form eines Photons abgeben, wodurch wiederum ein Leuchteffekt erreicht wird (Lakowicz 1999).

Aufgrund dieser Tatsachen eignet sich FRET zur Darstellung von Proteininteraktionen. Nutzt man nun ein geeignetes Farbstoff-Paar, deren Excitations- und Emissionsspektren, wie oben beschrieben, zusammen passen und koppelt sowohl Donor als auch Akzeptor an Antikörper, welche für zwei Proteine oder Enzyme, welche miteinander interagieren, spezifisch sind, so kann diese Interaktion sichtbar gemacht werden. Diese Sichtbarmachung erfolgt dann in verschiedenen Stufen. Zunächst binden die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper an ihre Targets. Stellt sich anschließend zwischen diesen beiden molekularen Targets die nötige definierte räumliche Nähe aufgrund tatsächlicher Interaktion her, so kommt es zu FRET. Da FRET bei einem zu großen Abstand zwischen Donor und Akzeptor nicht auftritt, ist die Darstellung dieses Effektes demnach der Nachweis der Interaktion der beiden Moleküle. Dieser Effekt ist in Abbildung 4 illustriert.

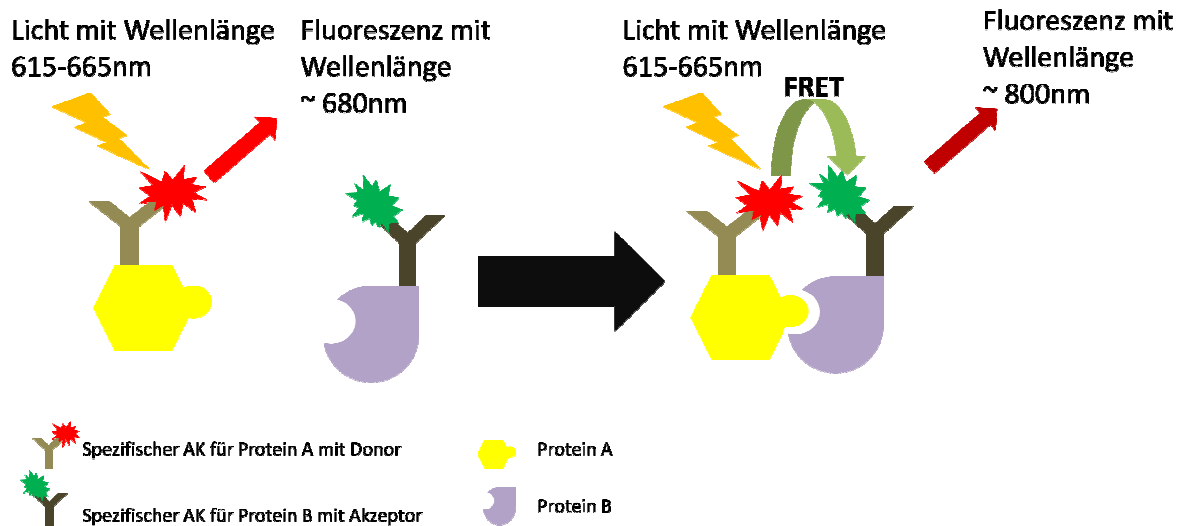


Abbildung 4: Schematische Darstellung von FRET am Beispiel von DY-682 und DY-782. Dabei stellt DY-682 den Donor und DY-782 den Akzeptor dar. Nach Kopplung der Fluorophore an spezifische Antikörper könnten diese wiederum an die jeweiligen Proteine binden. Bei Anregung mit der für den Donor geeigneten Wellenlänge nimmt dieser Photonen auf. Ohne räumliche Nähe kommt es nicht zum Energietransfer. Der Donor gibt die Energie also direkt als Photonen wieder ab. Somit kann nur die Fluoreszenz des Donors aufgefangen werden (links). Bei ausreichender räumlicher Nähe aufgrund von Proteininteraktion kommt es zum Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor. Dieser gibt die aufgenommene Energie als Fluoreszenz ab. Es kann somit die Fluoreszenzwellenlänge des Akzeptors detektiert werden ohne dass dieser direkt angeregt wurde (rechts).

Dass sich mittels FRET Interaktionen von Molekülen darstellen lassen, wurde bereits nachgewiesen. Dies geschah zum Beispiel durch die Anwendung des „green fluorescent protein“ oder „grünen Fluoreszenzproteins“ (GFP). Dabei handelt es sich um ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, welches eine gut sichtbare und effektive Lichtemission aufweist. Es besitzt dabei einen Excitationspeak bei 395 nm und 475 nm. Bei Anregung mit 395 nm emittiert es bei 508 nm und bei Anregung mit 475 nm bei 503 nm (Tsien 1998).

Für die Anwendung von FRET für die *in vitro* Darstellung von Proteinen gibt es ausreichend Beispiele. Marcus Fehr, Wolf B. Frommer und Sylvie Lalonde (Fehr et al. 2002) nutzen zum Beispiel das GFP zur Darstellung der Maltoseaufnahme durch lebende Zellen. Eine Bindung von Maltose führt dabei zu einer Änderung der Konformation der Periplasmatischen Bindungsproteine an welche die GFP's gebunden wurden. Durch die Änderung der Konformation kommt es zu einer Annäherung von Donor und Akzeptor und damit zu einer Ausbildung von FRET. Hoffmann et al. (Hoffman 2005) verwenden als FRET-Paar CFP/YFP (Cyanes Fluoreszenzprotein / Gelbes Fluoreszenzprotein). Dabei handelt es sich um Abwandlungen des GFP's. Von ihnen wurde mittels dieses FRET-Paares die Aktivität eines G-Protein-Gekoppelten-Rezeptors dargestellt. Auch Stockholm et al. (Stockholm 2005) verwendeten ein FRET-Paar bestehend aus CFP und YFP. Damit konnten sie die Aktivität einer intrazellulären Cystein-Protease nachweisen.



In vivo Untersuchungen mittels FRET, in denen eine Interaktion von mehreren Proteinen untersucht wurde, sind jedoch bisher kaum zu finden. Jin Zhang et al. (Zhang et al. 2010) beschreiben eine Untersuchung zur simultanen Messung sowohl der intrazellulären Calciumkonzentration in arteriellen Muskelzellen sowie der Myosin Leichte-Kette Kinase (myosin light-chain kinase - MLCK) Aktivität und des arteriellen Durchmessers. Dabei kamen transgene Mäuse zur Anwendung, welche einen Calcium / Calmodulin-abhängiges optisches FRET-Biomolekül synthetisieren. Dieses Biomolekül zeigt die Bindung von Calcium durch Änderung von FRET zwischen CFP und YFP an. FRET wird sonst allerdings hauptsächlich, wie oben beschrieben, zur präziseren Darstellung einzelner Targets verwendet.

Bei all diesen Arbeiten wurde jedoch nicht die bereits unter 1.2. *Molekulare Bildgebung als Diagnose-Vorsprung* beschriebenen Vorteile von NIRF-Farbstoffen genutzt. GFR stellt ein relativ großes Molekül dar, welches den Zellhaushalt stören kann und emittiert in einem Wellenlängenbereich, der nicht die hohe Gewebepenetration wie die Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten NIRF-Farbstoffe aufweist. Mit den bisherigen FRET-Darstellungen wurde meist nur die Aktivität eines Moleküls dargestellt. FRET bietet jedoch wie bereits beschrieben die Möglichkeit Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen sichtbar zu machen. Besonders in vivo ist somit eine Untersuchung von komplexen Prozessen möglich. Hier ist jedoch bisher kaum eine Darstellung erfolgt. In vivo wurde bisher vor allem eine Darstellung von einzelnen Molekülen mit Hilfe nur eines Fluoreszenzfarbstoffes durchgeführt. Der Einsatz von FRET ist hier noch kaum zu finden.

### 2.4. Zielstellung

Ziel der molekularen Bildgebung ist die optische Darstellung molekularer Veränderungen. Mittels FRET kann dabei die räumliche Nähe zweier Proteine sichtbar gemacht werden. Es lässt sich damit deren tatsächliche Interaktion nachweisen. Mittels geeigneter Targets und an diese speziell angepasste FRET-Sonden könnten Protein-Interaktionen z.B.: bei Entzündungsmechanismen sichtbar gemacht werden, bevor es zu morphologischen Veränderungen von Zellen, Geweben oder Organen kommt. Damit wird eine frühzeitige Diagnostik und somit ein bedeutender Zeitgewinn für die Behandlung von Patienten möglich. In dieser Arbeit soll zunächst die Basis für ein System gelegt werden, welches für den oben beschriebenen Einsatz geeignet ist. Dafür wurden zwei Farbstoff-Paare (ein FRET-Paar (DY-682/DY-782) und ein Kontroll-Paar (DY-505/DY-782)) verwendet. Diese beiden Paare sollen nun hinsichtlich der für den Nachweis von FRET nötigen Kriterien wie Abnahme der



Donorfluoreszenz und Zunahme der Akzeptorfluoreszenz untersucht werden.

Zunächst soll dies auf Nitrozellulosemembran durchgeführt werden um möglichst viele Störfaktoren organischer Systeme auszuschließen und isoliert die FRET-Eigenschaften darstellen zu können.

Des Weiteren soll geklärt werden, ob sich die Fluoreszenzeigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe nach Proteinkopplung ändern. Dafür wurden diese Fluoreszenzfarbstoff-Paare an unspezifisches IgG gekoppelt.

Im nächsten Schritt wird untersucht, ob die hergestellten proteinhaltigen Sonden durch lebende Zellen aufgenommen werden können und dabei der FRET-Effekt nachweisbar bleibt. Dabei wurden als Zellsystem Makrophagen gewählt, da diese aufgrund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose den Farbstoff in Endosomen oder Lysosomen aufnehmen können. Die inkubierten Zellen sollen dafür in einem geeigneten Imaging-Gerät dargestellt und auf ihre Fluoreszenz untersucht werden. Zum Nachweis der Internalisierung der Sonden durch die Makrophagen sollen diese abschließend mittels CLSM vermessen werden.

Nach erfolgreicher Internalisierung der Fluoreszenzfarbstoffe in die Makrophagen sollen die Fluoreszenzen im Tierversuch untersucht werden. Als erster Zwischenschritt soll untersucht werden, ob die in inkubierten Zellen nachgewiesenen FRET-Effekte auch noch durch die Haut der Versuchstiere nachweisbar bleiben. Dazu werden Makrophagen mit Farbstoff inkubiert. Diese werden anschließend Mäusen unter die Haut des Rückens appliziert. Die Fluoreszenz der Mäuse werden nach dieser Prozedur in einem Ganzkörperscanner vermessen. Dabei soll herausgefunden werden, welchen Einfluss die Autofluoreszenz der Mäuse auf die Darstellbarkeit der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe und den Nachweis von FRET hat.

Das Ziel des zweiten Schrittes der Tierversuche ist, dass nach intravenöser Gabe der proteinhaltigen Sonden diese von phagozytierenden Zellen aus dem Blutkreislauf der Tiere selbstständig aufgenommen werden und diese Zellen sich anschließend in einem vorher induzierten Entzündungsgebiet ansammeln. Es soll untersucht werden, ob sich zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen eine ausreichende räumliche Nähe herstellt und somit FRET stattfindet.

### 3. Substanzen, Geräte, Material und Methoden

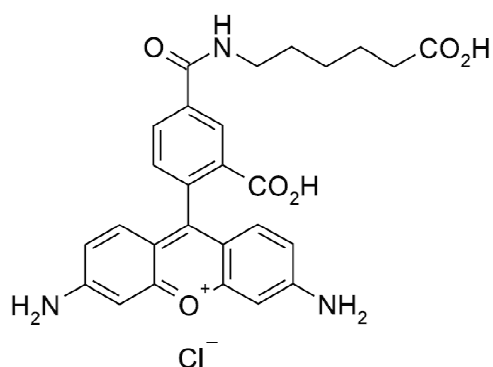
Im Nachfolgenden werden alle Substanzen, Geräte und Materialien, welche in dieser Arbeit Verwendung gefunden haben, aufgeführt. Dabei wird auf spezielle Substanzen, Geräte und Materialien besonders eingegangen und alle anschließend in dieser Arbeit durchgeführten Methoden ausführlich beschrieben.

#### 3.1. Substanzen

##### 3.1.1. Beschreibung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (siehe Abbildung 5 bis 7) stammen von der Firma Dyomics GmbH mit Sitz in Jena, Deutschland. Es handelt sich dabei um asymmetrische Cyanine. Sie sind als freie Säure oder als NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimidyl-ester) verfügbar. Letztere sind aufgrund der angefügten Gruppe in der Lage Verbindungen mit primären Aminogruppen einzugehen. Diese Reaktion läuft bei einem pH-Wert zwischen 8 und 9 ab, wodurch die Fluorophore zum Beispiel an Antikörper gekoppelt werden können. In dieser Arbeit wurden drei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche im Weiteren genauer charakterisiert werden.

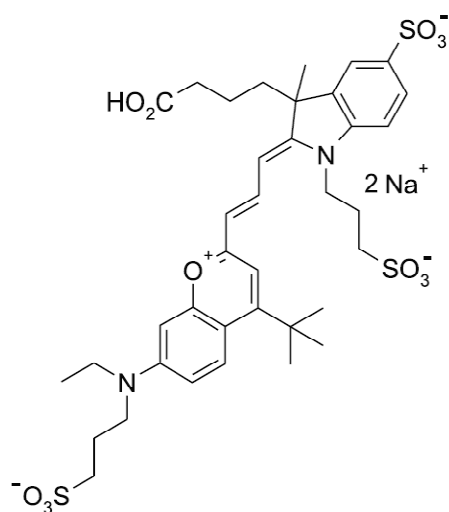
##### DY-505



Molare Masse (COOH):	523,97 g/mol
Molare Masse (NHS):	621,05 g/mol
Absorptionsmaximum:	505 nm
Emissionsmaximum:	530 nm
Molare Absorbanz:	80.000 M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
Löslich in Methanol, Ethanol, DMF, DMSO	

Abbildung 5: Chemische Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 (freie Säure) (Dyomics 2007).

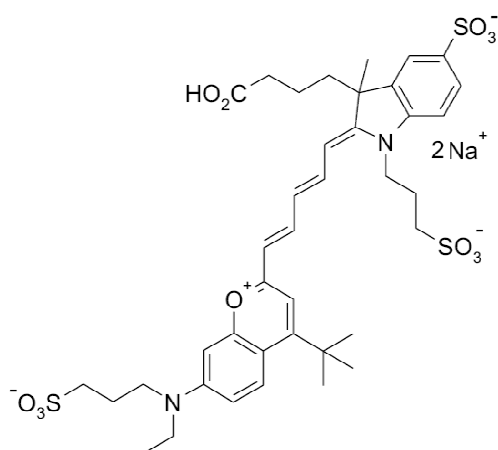
## DY-682



Molare Masse (COOH):	852,96 g/mol
Molare Masse (NHS):	950,03 g/mol
Absorptionsmaximum:	690 nm
Emissionsmaximum:	709 nm
Molare Absorbanz:	140.000 M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
Löslich in Wasser, Methanol	

Abbildung 6: Chemische Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 (freie Säure) (Dyomics 2007).

## DY-782



Molare Masse (COOH):	879,00 g/mol
Molare Masse (NHS):	976,07 g/mol
Absorptionsmaximum:	784 nm
Emissionsmaximum:	800 nm
Molare Absorbanz:	170.000 M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
Löslich in Wasser, Methanol	

Abbildung 7: Chemische Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 (freie Säure) (Dyomics 2007).

Die Fluoreszenzfarbstoffe DY-505 und DY-782 wurden von Toni Luge als negatives FRET-Paar identifiziert, da Emissionsspektrum von DY-505 und Absorptionsspektrum von DY-782 sich nicht überschneiden und somit auch kein Energietransfer möglich ist (Luge 2009).

Die Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 und DY-782 hingegen stellen laut Toni Luge ein positives FRET-Paar dar. Emissionsspektrum DY-682 und Absorptionsspektrum DY-782 überschneiden sich und ermöglichen somit die Übertragung von Energie in Form von FRET.

Die Spektren der beiden Farbstoff-Paare sowie deren Überschneidungen sind in Abbildung 8 dargestellt. Des Weiteren sind in den Diagrammen die zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzten Excitationsbereiche sowie die zur Darstellung verwendeten Detektionsbereiche dargestellt. Für das Paar DY-682/DY-782 wurde dabei die RED-Filter-Kombination verwendet, deren Excitationsbereich von 615 bis 665 nm und Detektionsbereich von 700 bis 900 nm reicht. Zur Darstellung des Paares DY-505/DY-782 wurde eine BLUE/RED-Filter-Kombination verwendet. Der Excitationsbereich liegt dabei bei 445 bis 490 nm und der Detektionsbereich für den Donor bei 515 bis 720 nm sowie der Detektionsbereich für den Akzeptor bei 700 bis 900 nm.

Die in der Abbildung 8 dargestellten Überschneidungsbereiche zeigen, dass für das Paar DY-682/DY-782 eine Energieübertragung im Sinne von FRET möglich ist, da das Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 das Excitationsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 in großem Maße überschneidet. Eine solch große Überschneidungsfläche ist für das Paar DY-505/DY-782 nicht festzustellen. Der Emissionsbereich des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 liegt zu weit vom Excitationsbereich des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 entfernt. Eine effektive Energieübertragung im Sinne von FRET ist hier nicht möglich.

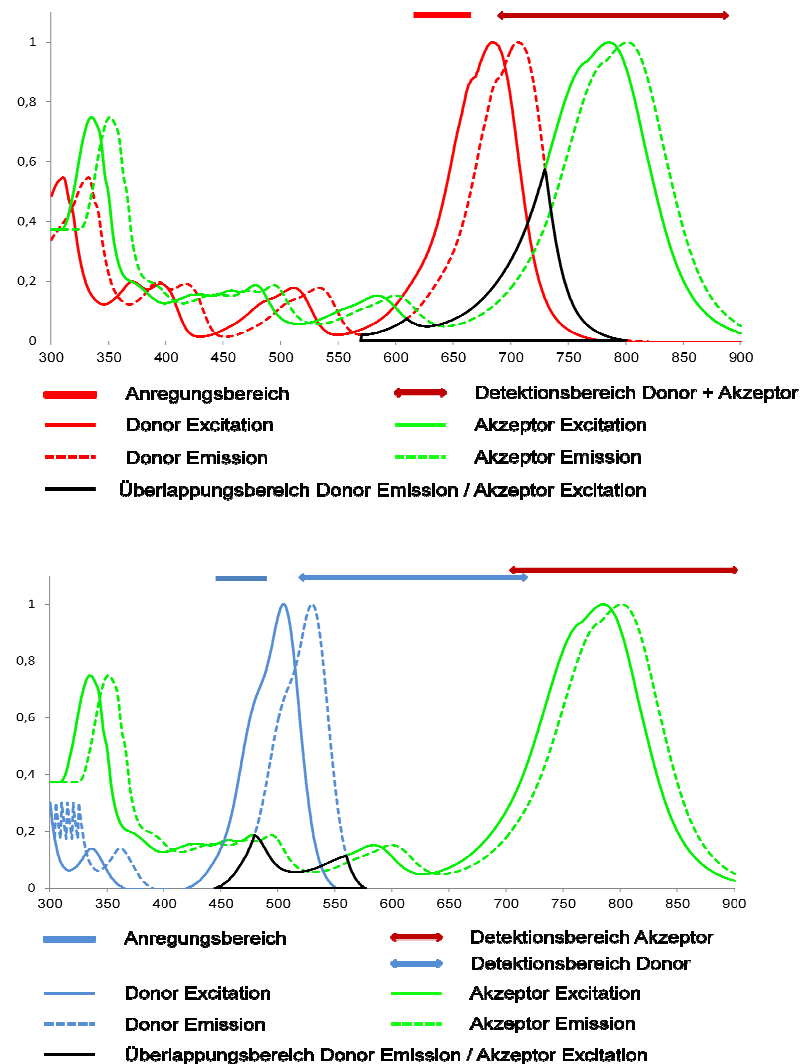


Abbildung 8: Dargestellt sind die Excitations- und Emissionsspektren der beiden Farbstoffpaare DY-682/DY-782 (oben) und DY-505/DY-782 (unten). DY-782 fungiert hier für zwei verschiedene Donoren als Akzeptor. Die Überlappungsbereiche des Emissionsspektrums des Donors und des Excitaionsspektrums des Akzeptors sind jeweils schwarz umrandet. Nur bei den oben dargestellten Verhältnissen des Paares DY-682/DY-782 überlappen sich die beiden Spektren ausreichend stark um FRET zu ermöglichen. Ebenfalls sind die genutzten Excitationsbereiche sowie die Detektionsbereiche dargestellt. Zur Darstellung des Paares DY-682/DY-782 wurde die RED-Filter-Kombination verwendet, deren Excitationsbereich von 615 bis 665 nm und Detektionsbereich von 700 bis 900 nm reicht. Zur Darstellung des Paares DY-505/DY-782 wurde eine BLUE/RED-Filter-Kombination verwendet. Hier liegt der Excitationsbereich bei 445 bis 490 nm und der Detektionsbereich für den Donor bei 515 bis 720 nm sowie der Detektionsbereich für den Akzeptor bei 700 bis 900 nm.

### 3.1.2. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

10x PBS	KCL	→ 2 g	→ 0,03 M (in A. dest.)
	NaCl	→ 80 g	→ 1,37 M (in A. dest)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	→ 2 g	→ 0,015 M (in A. dest)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei	→ 11,5 g	→ 0,08 M (in A. dest)
	Alle Substanze wurden abgewogen, zunächst in 800 ml A. dest. gelöst und danach auf 1 l aufgefüllt. Mittels HCl und NaOH wurde der pH Wert auf 7,4 eingestellt.		
1x PBS	KCL	→ 2 g	→ 0,003 M (in A. dest)
	NaCl	→ 80 g	→ 0,137 M (in A. dest)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	→ 2 g	→ 0,0015 M (in A. dest)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei	→ 11,5 g	→ 0,008 M (in A. dest)
	50 ml 10x PBS wurden mit 450 ml A. dest gemischt und der pH Wert mit HCl und NaOH auf 7,4 eingestellt.		
Coupling Buffer	0,84 g NaHCO <sub>3</sub>	→ 100 mM NaHCO <sub>3</sub>	
	2,92 g NaCl	→ 500 mM NaCl	
Die abgewogenen Substanzen wurden mit 100 ml Aqua dest. gemischt und der pH-Wert mittels HCl und NaOH auf 8 eingestellt.			
Sterile Gelatine	1 g Gelatine wurde 110 ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung anschließend mittels Magnetrührer vermischt (ca. 30 min → bis klare Lösung). Diese wurde anschließend autoklaviert (beim Autoklavieren gingen ca. 10% Wasser verloren).		
Zymosan 1%ig	10 mg Zymosan A / 1 ml Flüssigkeit = 1 mg / 100 µl Es wurde 1 mg Zymosan A in 100 µl PBS gelöst.		
Ethanol 70%	Zu 500 ml Ethanol 96% wurden weitere 185 ml Aqua dest. hinzugegeben.		

### 3.1.3. Sonstige Substanzen

In nachfolgender Tabelle sind alle von mir verwendeten Substanzen und deren Hersteller mit Firmensitz aufgelistet.

Tabelle 1: Substanzen und Hersteller

Substanzname	Hersteller
1M HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1M NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Destilliertes Wasser	Hauseigenes Leitungssystem
CASY@ton	Innovatis AG; Reutlingen, Deutschland
DMEM + 10% FKS	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
DMF (Dimethylformamide)	research grade, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DY-505-Carboxylic acid	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
DY-505-NHS-Ester	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
DY-682-Carboxylic acid	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
DY-682-NHS-Ester	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
DY-782-Carboxylic acid	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
DY-782-NHS-Ester	Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
Eis	Hauseigene Eismaschine
Ethanol 96% (vergällt)	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hanks BSS	PAA Laboratories GmbH, Austria
IgG from rabbit serum, solid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merk KG aA, Darmstadt, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Sephadex G-25 Medium	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden

### 3.2. Geräte

#### 3.2.1. Maestro<sup>TM</sup> In-Vivo Fluorescence Imaging System

Der Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager ist ein Gerät mit dessen Hilfe man den gesamten Körper von Kleintieren wie etwa Mäusen darstellen kann. Auf diese Weise kann man auf oder in Mäusen platzierte Fluoreszenzfarbstoffe nachweisen. Dazu wurde in dem Gerät eine Xenon-Lampe verbaut, welche Licht mit einer Wellenlänge von 500 bis 950 nm erzeugt. Mittels spezieller dieser Lampe vorgeschalteter Filter, so genannter Excitationsfilter, können verschiedene Spektren des Lichts zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen erzeugt werden, so genannte Excitationsspektren. Der Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager ist außerdem in der Lage mittels einer hochauflösenden Kamera und besonderer, vor diese Kamera zu schaltender Filter, so genannter Emissionsfilter, dass nach Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe durch diese erzeugte Licht zu detektieren. Dabei wird nicht nur im Bereich einer bestimmten Wellenlänge des Lichts aufgezeichnet, sondern das Gerät ist in der Lage in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 950 nm Signalintensitäten zu registrieren. Bei den verwendeten Excitationsfiltern handelt es sich um Band-Pass-Filter. Diese lassen nur einen bestimmten Wellenbereich des Lichtes passieren. Dass zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe verwendete Spektrum kann damit genau gesteuert und auf die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe angepasst werden. Von besonderer Bedeutung ist dies bei der Untersuchung von FRET-Effekten, da man hier nur den Donor anregen will. Der Akzeptor soll dabei nur indirekt durch den Donor und möglichst nicht durch das verwendete Excitationsspektrums angeregt werden.



Die einzusetzenden Emissionsfilter sind so genannte Long-Pass-Filter (longpass), dass heißt, sie lassen nur Licht über einer bestimmten Wellenlänge hindurch. Dies bietet den Vorteil, dass mittels geeigneter Filterwahl das verwendete Excitationslicht komplett geblockt wird, ohne dass es dadurch zu Verfälschungen der Messergebnisse kommt. Ebenso bietet sich die Möglichkeit das aufzunehmende Spektrum zu erweitern. Dies ist ebenfalls für die Untersuchung von FRET-Effekten von Bedeutung. Auf diese Weise kann das Spektrum ausreichend verlängert werden, um so die gesamte Fluoreszenz des Akzeptors aufnehmen zu können.

Wichtig bei der Aufnahme der Bilder ist die Einstellung der Belichtungszeit. Dabei kann am Gerät eine Belichtungszeit von 1 ms bis 5000 ms manuell eingestellt werden. Es ist jedoch auch möglich die Belichtungszeit vom Gerät automatisch ermitteln zu lassen. Die korrekte Einstellung der Belichtungszeit ist wichtig um Überbelichtungen in bestimmten Fluoreszenzbereichen zu vermeiden. Überbelichtungen stören im Anschluss das problemlose Trennen der verschiedenen Spektren. Es kommt außerdem zu fehlerhaften Messungen in Bereichen, welche zuvor überbelichtet wurden.

Wie bereits erwähnt, ermittelt das Gerät die Signalstärke bei verschiedenen Wellenlängen. Standardmäßig wird die Fluoreszenzintensität alle 10 nm Wellenlänge des Lichtes erfasst. Dieser Abstand kann jedoch verändert werden bis hinunter zu einer Aufnahme alle 1 nm. Auf diese Art werden die Fluoreszenzspektren bestimmt. Diese werden anschließend zu einem so genannten „Cube“ zusammengefasst. Aus diesem können dann wiederum die Fluoreszenzspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe isoliert werden. Sind verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe in ein und demselben Untersuchungsobjekt (Nitrozellulosemembranen, Zellen oder Tiere) enthalten und sind mittels des Gerätes bereits deren Einzelspektren bestimmt worden, können aus dem Gesamtspektrum des gemischten Untersuchungsobjektes die Einzelspektren der verschiedenen enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe herausgefiltert werden. Ein solcher Vorgang wird als „Unmix“-Vorgang bezeichnet.

Die weitere Bearbeitung der gewonnenen Daten am Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers mittels der zugehörigen Software Maestro 2.4.3 wird im Abschnitt 2.4.2.4. *Bedienung des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers* ausführlich erklärt.

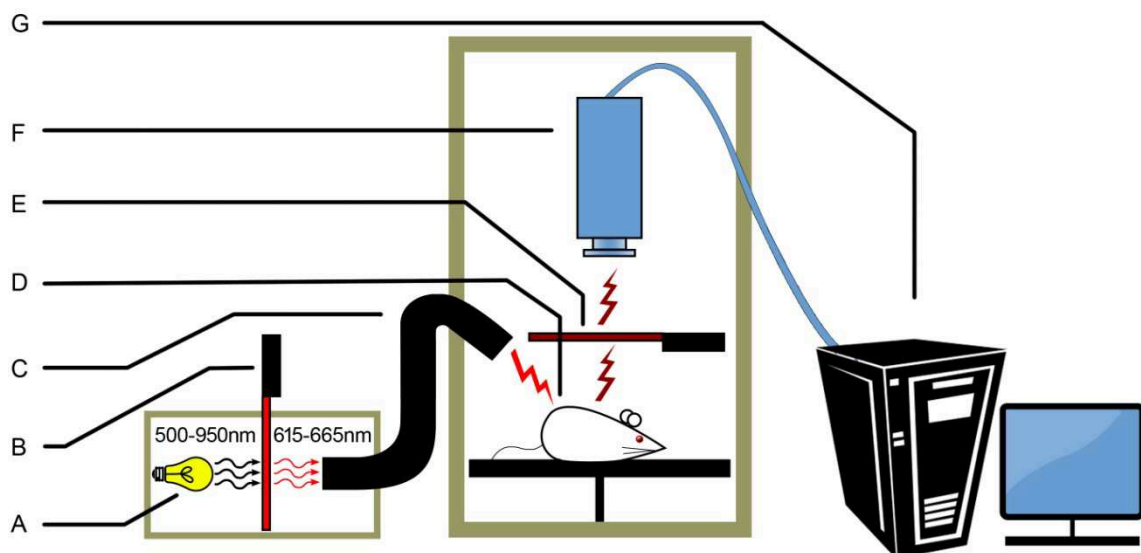


Abbildung 9: Der Maestro™-Kleintierimager. Oben: Das in der Arbeitsgemeinschaft für Experimentelle Radiologie verwendete Gerät. Unten: Schema der Funktionsweise des Maestro™-Kleintierimagers. Mittels einer Xenon-Lampe (A) wird dabei Licht in einem Wellenlängenbereich von 500 bis 950 nm erzeugt, dieses wird anschließend durch einen auswechselbaren Excitationsfilter (B) geleitet, hierbei handelt es sich um einen Band-Pass-Filter, wodurch, hier am Beispiel des RED-Filters, nur Licht im Wellenlängenbereich 615 bis 665 nm durchgelassen wird, dieses Licht wird anschließend über eine Fiber-Optische-Leitung (C) in den Kleintierimager und auf das zu untersuchende Untersuchungsobjekt (Nitrozellulosemembran, Zellen oder Maus) (D) geleitet. Der Farbstoff im untersuchten Untersuchungsobjekt wird dadurch angeregt und leuchtet mit einer anderen Wellenlänge zurück. Dieses Licht gelangt durch den Emissionsfilter (E) zur Kamera (F), beim Emissionsfilter handelt es sich dabei um einen Long-Pass-Filter, welcher nur Licht über einer bestimmten Wellenlänge durchlässt und somit das mit in das Gerät geleitete Excitationslicht von der Kamera fernhält. Die von der Kamera aufgenommenen Daten werden dann an einen PC mit entsprechender Software weitergeleitet (G).

### 3.2.2. Sonstige Geräte

In nachfolgender Tabelle sind alle von mir verwendeten Geräte mit Hersteller und deren Firmensitz aufgeführt.

Tabelle 2: Geräte und Hersteller

Gerätename	Hersteller
Brenner	schuett phoenix, schuett-biotec GmbH; Göttingen Heraeus vulcan, Heraeus; Hanau
Brutschrank	Hera cell, Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 541R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Feinwaage isocal AC 211P	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Laborwaage, Kern 440-47N	Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Maestro 2.2	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Magnetrührer	Barnstead/Termolyne, Dubuque, Iowa, USA
Mehrkanalpipette	Firma Brandt
Phasenkontrastmikroskop	Olympus ck40, Olympus Deutschland GmbH; Hamburg
Pipettenakku	akku-jet pro, Brand; Wertheim
Schüttelinkubator Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spektrophotometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Vakuumpumpe	Vacunsafe, IBS Integra Biosciences; Fernwald
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Hackermoos, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries INC., Bohemia, N.Y., USA
Werkbänke	Holten LaminAir, Hera safe, Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Zellzähler	CASY Model TT, Innovatis AG; Reutlingen
Zentrifuge	Biofuge Primo, Fisher Scientific GmbH; Schwerte

### 3.3. Materialien

#### 3.3.1. Charakterisierung der Zelllinie J774

Bei den für die Versuche verwendeten Zellen handelt es sich um Makrophagen der Zelllinie J774. Diese Zellen wurden 1968 aus einem Tumor weiblicher BALB/c Mäuse gewonnen. Sie produzieren Interleukin-1 und Lysozym und präsentieren Rezeptoren für Immunglobulin (Fc-Rezeptoren) und Complement (C3). Ihr Wachstum wird durch Dextran Sulfate, PPD und LPS gehemmt. Zum optimalen Wachstum benötigen sie DMEM mit 10% FKS. Ihre Verdopplungszeit liegt bei etwa 35 Stunden. Sie sollten bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Spannung von 5% inkubiert werden. Eine Passagierung sollte alle 4 – 5 Tage erfolgen. Die Durchführung einer solchen Maßnahme wird in Abschnitt 2.2.3.1.2. *Passagieren* beschrieben. (Ralph et al. 1976)

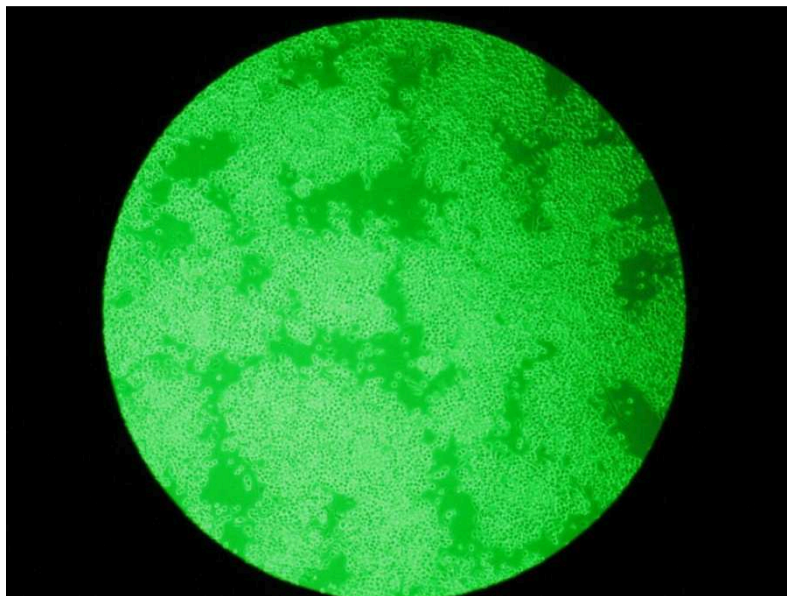


Abbildung 10: Aufnahme von Makrophagen der Zelllinie J774 mittels Phasenkontrastmikroskop. Die Makrophagen wurden für die späteren in vitro Versuche verwendet.

### 3.3.2. Charakterisierung der verwendeten Mäuse

Bei dem verwendeten Mäusen handelte es sich um männliche Mäuse aus dem NMRI (Naval Medical Research Institut) Stamm.

Sie stammen ursprünglich aus der Schweiz. Hier wurden sie 1937 von Clara Lynch an Poiley übergeben. Dieser führte 51 Generationen Inzucht an ihnen durch. Danach wurden die Tiere zum NMRI transferiert. 1979 schließlich wurden sie in die Charles River Labore des Central Institute for Laboratory Animal Breeding Hannover überführt.

Es handelt sich bei diesen Mäusen um Albinos. Sie finden vor allem Anwendung in Bereichen der Toxikologie, Teratologie, Pharmakologie und Physiologie. Ihre speziellen Charakteristika sind schnelles Wachstum und eine hohe Lernkapazität. Sie weisen eine hohe Reproduktionsrate auf und können Wasser über eine Flasche erhalten. Sägemehl wurde zur Unterlage im Käfig ausgestreut. Die Tiere wurden eine Woche vor Durchführung der Experimente auf weißes nicht-fluoreszierendes Futter umgestellt.

Männchen sind bereits ab einem Alter von 8 Wochen aggressiv. Deshalb sollten die Tiere (vor allem Männchen) nach Möglichkeit einzeln gehalten werden. (CHARLES RIVER 2010)



Abbildung 11: Abbildung einer NMRI-Maus. Mäuse dieses Stammes wurden für die Durchführung der in vivo Versuche verwendet. (CHARLES RIVER 2010)

### 3.3.3. Sonstige Materialien

In nachfolgender Tabelle sind alle von mir verwendeten Materialien und deren Hersteller mit Firmensitz aufgeführt.

Tabelle 3: Materialien und Hersteller

Materialname	Hersteller
Alufolie	FORA GmbH, Radolfzell, Deutschland
Bechergläser	Fisher Scientific GmbH, Wien, Österreich
CASY-Kapillarmessgefäß	Innovatis AG; Reutlingen
Eppendorfcups 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Falconröhrchen	BD Biosciences; Heidelberg
Fuldapipetten 5 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glasflächen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt
Glaswolle	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Handschuhe	Ansell SensiClean, München, Deutschland
Maestro Emission Filter, Blue 515 nm longpass	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Emission Filter, Deep Red 750 nm longpass	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Emission Filter, NIR 800 nm longpass	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Emission Filter, Red 700 nm longpass	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Excitation Filter, Blue 445-490 nm	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Excitation Filter, Deep Red 671-705 nm	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Excitation Filter, NIR 710-760 nm	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA
Maestro Excitation Filter, Red 615-665 nm	Cambridge Research & Instrumentation INC., Woburn, MA, USA

## SUBSTANZEN, GERÄTE, MATERIAL UND METHODEN

---

Messzylinder 50 ml	DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland
Microcon Ultracel YM-100	Millipore Corporation, Bedford, USA
Nitrocellulosemembran Hybond-C Extra	Amersham Biosciences, Uppsala , Schweden
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	Assistent-Präzision Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Petrischale	
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Quarzküvetten, d = 1 cm	Hellma GmbH & Co KG, Müllheim, Deutschland
Ständer für Cups	Kartell Spa, Noviglio, Italy
Stativ mit Klemmen zum Halten der Fuldapipetten	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Wattestäbchen	Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter, Deutschland
Zellkulturflasche groß 175 cm <sup>2</sup>	Cellstar, greiner bio-one; Frickenhausen
Zellkulturflasche mittel 75 cm <sup>2</sup>	Cellstar, greiner bio-one; Frickenhausen
Zellkulturflasche klein 25 cm <sup>2</sup>	Cellstar, greiner bio-one; Frickenhausen
Zellschaber	Cellscraper, greiner bio-one; Frickenhausen

### 3.4. Methoden

Die Zusammensetzung aller im Folgenden verwendeter Lösungen sind unter Punkt 2.1.2 *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen* aufgeführt.

#### 3.4.1. Herstellung der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe

Zunächst sollen die zur Herstellung der verwendeten IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (im Weiteren auch Sonden genannt) nötigen Prozesse und Schritte beschrieben werden.

##### 3.4.1.1. Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an unspezifische IgG-Moleküle

Verwendete Lösungen:       Coupling Buffer (siehe 2.1.2. *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen*)

                                  Gelöste NHS-Ester der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe

Verwendete Substanzen:     solid IgG from rabbit serum

Für die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an unspezifische IgG-Moleküle wurden die Hinweise des Herstellers beachtet. Bei einem pH-Wert von 8 koppeln die NHS-Ester der Fluoreszenzfarbstoffe an die Aminogruppen der Antikörper (Dyomics 2007).

Für die Kopplungen wurde zunächst 1 mg IgG mit Hilfe einer Feinwaage in einen Cup eingewogen. Anschließend wurden 500 µl Coupling Buffer zugeben und das ganze mittels Vortex Genie 2 so lange behandelt bis das gesamte IgG aufgelöst war. Es wurde somit eine Konzentration von 2 mg/ml erreicht. Danach wurde die vorher berechnete Farbstoffmenge (Verhältnis 1:6) zugegeben. Errechnet wurden dabei bei einer Menge von 1 mg IgG für DY-505 1,24 µl, für DY-682 1,9 µl und für DY-782 1,96 µl. Das entstandene Gemisch wurde zunächst erneut mit dem Vortex Genie 2 behandelt und anschließend für 2 h bei 23 °C und 900 rpm mit dem Schüttelinkubator inkubiert.





Abbildung 12: Der für die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an die unspezifischen IgG-Moleküle verwendete Schüttelinkubator der Arbeitsgemeinschaft für Experimentelle Radiologie.

### 3.4.1.2. Gelpermeationschromatographie

Eine Auftrennung der unter 2.4.1.1. *Kopplung an unspezifische Antikörper* erhaltenen Lösungen war nötig, da sich in diesen noch immer sowohl IgG-gebundener als auch freier Farbstoff befindet. Für die weiteren Versuche sollte aber möglichst nur an IgG-gebundener Farbstoff zur Verfügung stehen.

Prinzip der Gelpermeationschromatographie:

Verwendung findet hier eine Säule, welche mit kleinen porösen Kügelchen eines hochvernetzten Materials gefüllt wird (stationäre Phase). Durch diese wird anschließend eine Flüssigkeit hindurch geleitet (mobile Phase). Die in der mobilen Phase gelösten Stoffe interagieren mit der stationären Phase. Dabei können kleine Moleküle durch die Poren in die Kügelchen hinein, große Moleküle jedoch an den Kugeln vorbei wandern. Dadurch steht den kleinen Molekülen ein größeres Verteilungsvolumen zur Verfügung, wodurch die Durchflussgeschwindigkeit der kleinen Moleküle gegenüber den großen Molekülen langsamer ist. Da die Fluoreszenzfarbstoffe (als Beispiel DY-782 mit  $976,07 \text{ g/mol}$ ) im Vergleich zu IgG ( $150.000 \text{ g/mol}$ ) eine relativ geringe Molekülmasse aufweisen, wandern aufgrund des oben beschriebenen Effektes die freien Fluoreszenzfarbstoffe deutlich langsamer durch die Säule als die an IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe.



Abbildung 13: Prinzip der Gelpermeationschromatographie. Dieses Verfahren wurde für die Auftrennung der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe von den freien Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.

Durchführung der Methode:

Verwendete Lösungen: 1x PBS (siehe 2.1.2. *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen*)

Inkubierte Farbstofflösung aus 2.4.1.1. *Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an unspezifische IgG-Moleküle*

Verwendete Substanzen: Sephadex G-25 Medium

Als erstes wurde eine ausreichende Menge an Sephadex-Medium abgewogen. Dabei musste beachtet werden, dass Sephadex beim Quellen auf ein 5faches Volumen anschwillt. Zum Befüllen der verwendeten 5 ml Fuldapipetten genügte es also pro Pipette 1 g Sephadex bereitzustellen. Dieses wurde dann mit PBS übergossen und für 2 h zum Quellen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Sephadex-Medium stellte anschließend die oben beschriebene stationäre Phase dar.

Nach dem Quellen wurden die Säulen vorbereitet. Dabei wurde in die Spitze einer Fuldapipette Glaswolle gestopft und diese daraufhin mit PBS gefüllt. Die Pipette wurde anschließend mit gequollenen Sephadex ausgefüllt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass keine Luftblasen oder Ringe im Sephadexmedium entstanden und dass die Pipette während des gesamten Versuches nicht trocken läuft. Schließlich wurde das Gemisch aus an IgG-

gekoppeltem und freiem Farbstoff aufgegeben. Von oben wurde danach weiter PBS nachgegeben. Das PBS stellte hierbei die bereits erwähnte mobile Phase dar. Allmählich entstanden zwei Banden, wobei die unterste der beiden Banden aufgefangen wurde. Diese enthielt den an IgG-gebundenen Farbstoff und eine definierte Menge freies IgG. Die oberste Bande wurde verworfen. Sie enthielt lediglich den restlichen freien Farbstoff.

Abbildung 14 zeigt eine solche Sephadexsäule bei der Auftrennung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682, in welcher sich bereits zwei Banden im Sephadex-Medium gebildet haben.

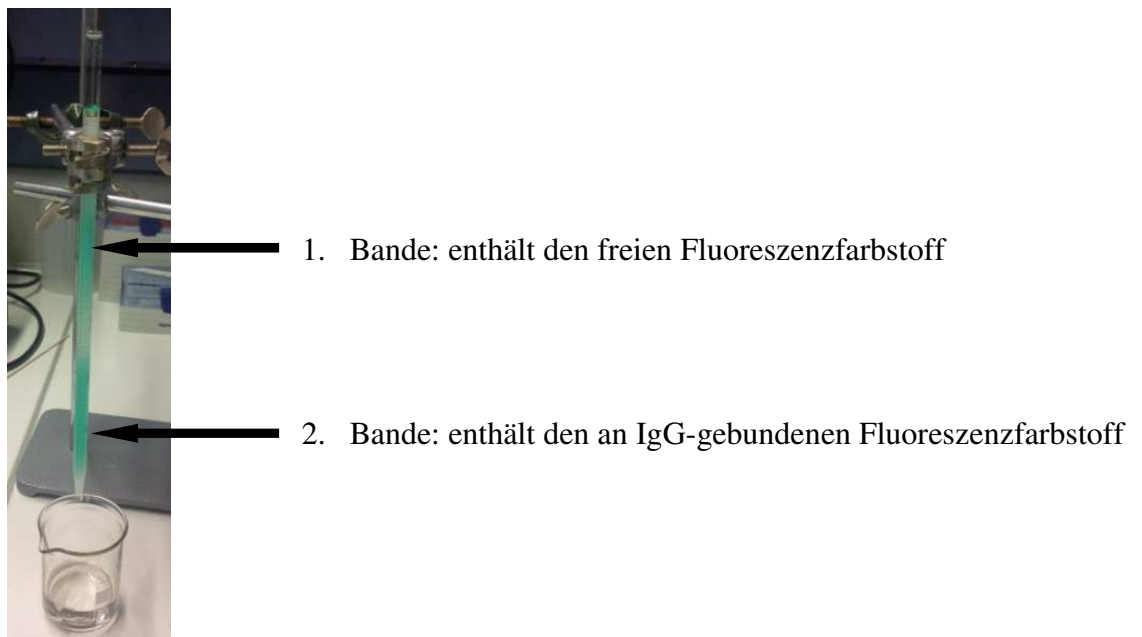


Abbildung 14: Dargestellt ist eine Sephadexsäule während der Auftrennung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 in IgG-gekoppelten und freien Fluoreszenzfarbstoff. Dabei stellt die obere 1. Bande die verbliebenen freien Fluoreszenzfarbstoffe und die untere 2. Bande die IgG-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe dar.

### 3.4.1.3. Aufkonzentration der Eluate

Eine Aufkonzentration der Eluate war nötig, weil insbesondere für die in vitro und in vivo Versuche eine ausreichend hohe Ausgangskonzentration des an IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes benötigt wurde. Für die in vitro Versuche (beschrieben unter 2.4.3.2. *Internalisierungsversuche mit Zellkulturflaschen*) war dies unumgänglich, da das eingesetzte Medium zur Ernährung der Zellen nicht zu stark verdünnt werden durfte. Für die in vivo Versuche (beschrieben unter 2.4.4. *Tierversuche*) war dies ebenfalls notwendig. Die benötigte Stoffmenge musste in ein ausreichend kleines Volumen gebracht werden, damit dieses den Mäusen dann problemlos intravenös appliziert werden konnte.

Prinzip für die Aufkonzentration der Eluate:

Verwendet wurden Filtermembransysteme mit so genannten cut-off Filtern. Darunter versteht man Filter mit einer definierten Porengröße in ihrer Membran. Dadurch werden nur Substanzen mit einer kleineren Molekülmasse als die durch die Poren der Membran passenden Molekülmasse (sogenannter cut-off) hindurch gelassen. Große Moleküle bleiben zurück, während kleinere Moleküle wie Wasser und Salze abzentrifugiert werden. Der Überstand stellt somit das Konzentrat dar.

Durchführung:

Verwendete Lösungen:                      Kopplungseluat aus 2.4.1.2. *Gelpermaetionschromatographie*

Verwendet wurden Amicon Ultra Centrifugal filter Units. Diese haben einen cut-off (siehe *Prinzip für die Aufkonzentration der Eluate*) bei etwa 10 kDa. Der Farbstoff wurde in die Filtereinsätze gegeben. Diese wurden in spezielle dafür vorgesehene Cups eingesetzt. Die so vorbereiteten Cups wurden in der Zentrifuge wie vom Hersteller angegeben bei 14.000 g zentrifugiert, bis eine ausreichend große Menge Wasser abzentrifugiert wurde. Die eingestellte Zeit betrug dabei etwa 30 min. Das Konzentrat wurde anschließend in Low-Binding-Tubs (Tubes mit geringer Proteinbindung an ihrer Oberfläche) zurückpipetiert.

### 3.4.1.4. Analytik der Eluate

Verwendete Lösungen: 1x PBS (siehe 2.1.2. *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen*)

Konzentrate aus 2.4.1.3. *Aufkonzentration der Eluate*

Die gewonnenen Konzentrate wurden am Spektrophotometer analysiert und somit die Absorptionsspektren der in den Konzentraten enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe aufgezeichnet. Dabei wurde als Referenzspektrum reines PBS verwendet. Dieses wurde mittels der Wavescan-Software bei jeder Messung automatisch vom Spektrum der untersuchten Lösung abgezogen. Zur Messung wurde ein Messbereich von 250 nm bis 900 nm gewählt. Durch die hohe Aufkonzentration der Eluate wurden stets vor der Messung 2 µl Konzentrat mit 48 µl PBS verdünnt. Somit entstand eine Lösung mit einer 1:25 Verdünnung des Ausgangskonzentrates. Nach der Messung wurde die für die Lösung ermittelte Konzentration mit 25 multipliziert um die Konzentration des Ausgangskonzentrates zu errechnen. Dies war notwendig da sonst die Absorption einen Wert von größer 3 erreicht hätte. In diesem Bereich wird jedoch ein so großer Anteil des Lichtes absorbiert, sodass sinnvolle Messungen nicht mehr möglich sind.

Aus den gewonnenen Messwerten wurden die Werte bei 280 nm als Protein-Peak für die Berechnung der IgG Konzentration verwendet. Mittels des von der Firma Dyomics für jeden der Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung gestellten Correction Factors (CF) konnte die Beeinflussung des Messwertes bei 280 nm durch den entsprechenden Farbstoff herausgerechnet werden (Abbildung 15, A). Zur Berechnung der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes wurde die größte gemessene Absorption bei einer Wellenlänge > 280 nm gewählt ( $A_{\max}$ ). Mit dieser wurde mittels der in Abbildung 15, B gezeigten Formel die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration bestimmt.

$$\text{A) } c_{IgG} = \frac{A_{280} - (CF_{DY} \cdot A_{\max})}{\epsilon_{IgG} \cdot d}$$

$$\text{B) } c_{DY} = \frac{A_{\max}}{\epsilon_{DY} \cdot d}$$

Abbildung 15: Die für die Berechnungen der Konzentrationen A) von IgG und B) des Fluoreszenzfarbstoffes verwendeten mathematischen Formeln

Anschließend wurde aus den bestimmten Konzentrationen die DY/Protein-Ratio bestimmt. Diese erlaubt eine Beurteilung darüber, ob die Kopplung Farbstoff-IgG erfolgreich war. Eine Ratio im Bereich von 1,5 bis 2 lässt auf eine erfolgreiche Kopplung schließen.

Für die späteren Berechnungen der einzusetzenden Mengen an Konzentrat wurde die hier ermittelte Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes genutzt.

Abbildung 16 zeigt ein Beispiel eines mittels des Spektrophotometer gewonnenen Absorptionsspektrums, hier des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782.

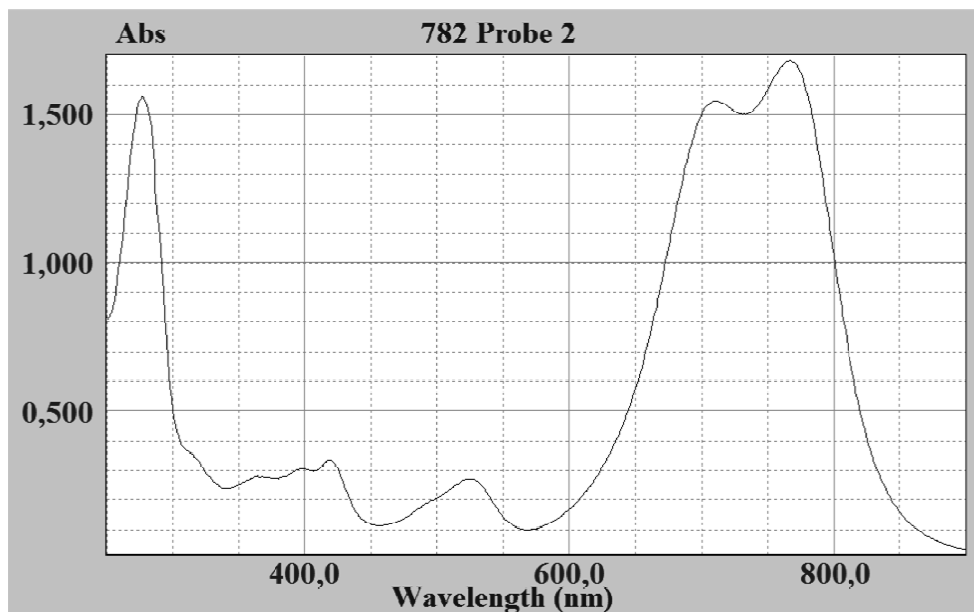


Abbildung 16: Beispiel einer Spektrophotometerkurve für den Farbstoff DY-782 aufgenommen mittels der Wavescan-Software. Gemessen wurde dabei von einer Wellenlänge von 250 nm bis 900 nm. Sie steht repräsentativ für die Spektrophotometerkurven der anderen Fluoreszenzfarbstoffe. Zu sehen ist der Protein-Peak bei einer Wellenlänge von 280 nm sowie zwei Peaks im Wellenlängenbereich von 700 nm und 750 nm. Diese beiden letzten Peaks stellen das Absorptionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes dar.

### 3.4.2. Untersuchung von FRET- und Quenching-Effekten der Sonden

#### 3.4.2.1. Nachweis von FRET nach Fixierung der Sonden auf Nitrozellulosemembran

Verwendete Lösungen:      1x PBS (siehe 2.1.2. *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen*)  
DMF  
Freie Fluoreszenzfarbstoffe  
Konzentrate der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe aus  
2.4.1.3. *Aufkonzentration der Eluate*

Zunächst wurde ein Stück Nitrozellulosemembran (etwa 10 x 4 cm) zurecht geschnitten, sodass die später aufgetragenen Farbstoff-Spots ausreichend Platz haben und nicht ineinander laufen konnten. Anschließend wurden 2 µl der jeweiligen Fluoreszenzfarbstofflösung auf die Nitrozellulosemembran aufgegeben. Dazu wurde von links nach rechts jeweils zunächst der entsprechende Donor allein, dann der Akzeptor allein, schließlich Donor und Akzeptor als Paar und abschließend ausschließlich das jeweilige Lösungsmittel aufgetragen.

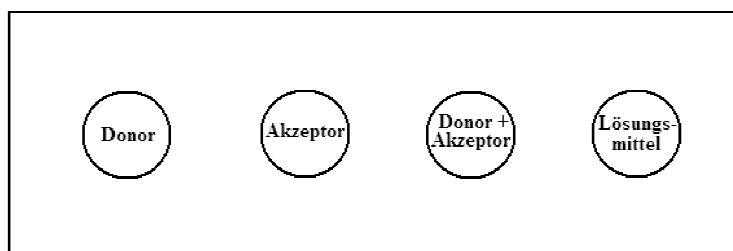


Abbildung 17: Schema der auf Nitrozellulosemembran aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoffe; v.l.n.r. Donor allein, Akzeptor allein, Donor und Akzeptor als Paar, Lösungsmittel. Dieses Schema wurde für die Untersuchung von FRET-Paar und Kontroll-Paar auf Nitrozellulosemembran verwendet. Dabei wurde je Spot 2 µl Flüssigkeit aufgetragen.

Die so präparierten Membranen wurden anschließend im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Die dabei durchgeführten Schritte werden in 2.4.2.4. *Bedienung des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers* beschrieben.

Verwendet wurden zur Vermessung des Farbstoffpaares DY-682/DY-782 die RED-Filter-Kombination und zur Vermessung des Farbstoffpaares DY505/DY782 ein Multifiltersetting mit BLUE und DEEPRED-Filter.

### 3.4.2.2. Parallele Darstellung von IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff

Als nächstes wurden die gekoppelten Sonden mit den freien Fluoreszenzfarbstoffen verglichen um festzustellen, welche Unterschiede zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff zu finden sind.

Zunächst wurde ebenfalls ein Stück Nitrozellulosemembran in Form geschnitten (etwa 6 x 6 cm). Anschließend wurden für die Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 und DY-782 Lösung mit einer Konzentration von 0,01nmol/ $\mu$ l jeweils mit IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff hergestellt. Davon wurden 2 $\mu$ l je Spot nach dem in Abbildung 18 gezeigten Schema auf das Stück Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die so präparierte Membran wurde anschließend im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Die dabei durchgeführten Schritte werden in 2.4.2.4. *Bedienung des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers* beschrieben.

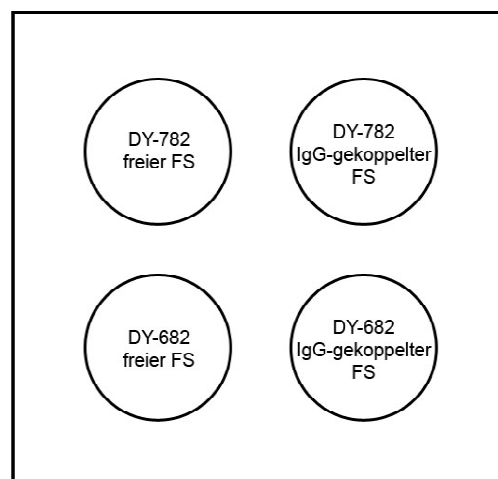


Abbildung 18: Schema für die Auftragung der Fluoreszenzfarbstoffe auf die Nitrozellulosemembran für die Gegenüberstellung von IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff. Dabei wurde je Spot ein Volumen von 2  $\mu$ l einer Lösung mit einer Konzentration von 0,01 nmol/ $\mu$ l aufgetragen.



### 3.4.2.3. Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe in bestimmten Konzentrationsbereichen

Zur Untersuchung des Quenching-Effektes wurde der Farbstoff DY-682 repräsentativ verwendet und dieser beginnend mit einer Ausgangskonzentration von 23,45 nmol/μl für den freien Farbstoff und 0,011614 nmol/μl für den IgG-gekoppelten Farbstoff jeweils 1:10 in Cups weiterverdünnt. Die Endkonzentrationen betrugen dabei 0,0023 nmol/μl für den freien Farbstoff und 0,000001 nmol/μl für den IgG-gekoppelten Farbstoff. Für die weitere Verdünnung wurden unterschiedliche Lösungsmittel genommen. Zum einen wurde jeweils mit dem Mittel weiter verdünnt in welchem der Farbstoff bereits gelöst war (freier Farbstoff DMF, IgG-gekoppelter Farbstoff PBS), zum anderen wurde jeweils mit destilliertem Wasser und Medium weiter verdünnt. Die vorbereiteten Cups wurden wie in Abbildung 19 gezeigt im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager platziert und vermessen. Die dabei durchgeführten Schritte sind in 2.4.2.4. *Bedienung des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers* genauer beschrieben. Um eine bessere Abhebung besonders geringer Floreszenzen vom Hintergrund zu erhalten wurde dem DY-682-Signal hier die Falschfarbe Gelb zugewiesen.

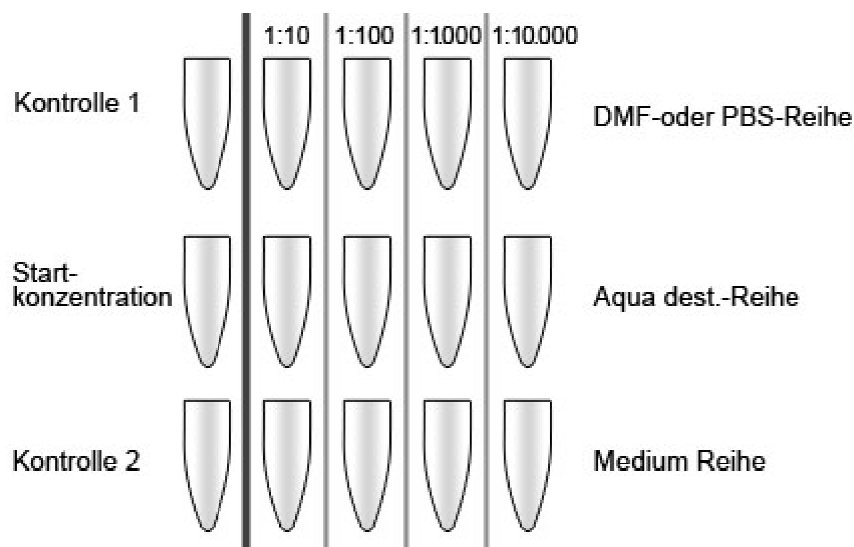


Abbildung 19: Schema für die Positionierung der Cups im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager. Dabei wurden links die Kontrollen sowie die Startkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffes platziert. Im rechten Bereich wurden die zunehmenden Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000 entsprechend ihres Verdünnungsmittels platziert.

## 3.4.2.4. Bedienung des Maestro™-Kleintierimagers

Der Bearbeitungsablauf am Maestro™-Kleintierimagers ist bei jeder Untersuchung ähnlich. Als erstes wurde das geeignete Filterset bestehend aus einem Excitations- und einem Emissionsfilter ausgewählt. Die Art des für die Untersuchung gewählten Filtersets, ist bei der Beschreibung der jeweiligen Versuche angegeben. Zur Übersicht sind in Tabelle 4: alle in dieser Arbeit verwendeten Filterkombinationen und deren Wellenlängenbereiche angegeben.

Tabelle 4: Übersicht aller verwendeter Filter-Kombinationen mit Auflistung der dafür verwendeten Filter, der abgedeckten Wellenlängen und der damit entsprechend dargestellten Fluoreszenzfarbstoffe mit deren Excitations- und Emissionsmaxima.

Bezeichnung	Filter	Abgedeckte Wellenlänge	Dargestellter Fluoreszenzfarbstoff	Excitations- und Emissionsmaxima
BLUE-Filter-Kombination	Ex: BLUE	445-490 nm	DY-505	Ex: 505 nm
	Em: BLUE	515 nm longpass		Em: 530 nm
BLUE-RED-Filter-Kombination	Ex: BLUE	445-490 nm	DY-782 (bei Anregung von DY-505 als Donor)	Ex: 784 nm
	Em: RED	700 nm longpass		Em: 800 nm
BLUE-DEEPRED-Filter-Kombination	Ex: BLUE	445-490 nm	DY-782 (bei Anregung von DY-505)	Ex: 784 nm
	Em: DEEPRED	750 nm longpass		Em: 800 nm
RED-Filter-Kombination	Ex: RED	615-665 nm	DY-682	Ex: 690 nm
	Em: RED	700 nm longpass		Em: 709 nm
NIR-Filter-Kombination	Ex: NIR	710-760 nm	DY-782 (bei Anregung von DY-682)	Ex: 784 nm
	Em: NIR	800 nm longpass		Em: 800 nm

Nach Auswahl und Einsetzen der Filter wurden die jeweiligen Untersuchungsobjekte (Nitrozellulosemembran, Zellen, Mäuse) optimal auf dem Tisch des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers platziert. Dazu wurde über die zugehörige Software die Funktion „Live-Bild“ eingeschaltet. Diese ermöglicht das aktuell aufgefangene Bild der Kamera zu sehen. die Position der Untersuchungsobjekte (Nitrozellulosemembran, Zellen, Mäuse) zur Kamera konnte somit beurteilt werden. Nachdem das Untersuchungsobjekt (Nitrozellulosemembran, Zellen, Mäuse) ausgerichtet war, wurde die Höhe des Tisches eingestellt. Hierdurch wurde ein Vergrößerungseffekt erzeugt. Kleinere Untersuchungsobjekte konnten, indem sie näher an die Kamera heran geholt wurden, größer dargestellt werden. Größere Untersuchungsobjekte hingegen konnten, indem sie weiter von der Kamera weg platziert wurden, in vollem Umfang dargestellt werden. Bei der Einstellung des Tisches wurde darauf geachtet, dass die Entfernungen der Lichtquellen für das Excitationslicht an die jeweilige Tischposition angepasst wurden. Im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager ist dabei jeder Tischposition eine Zahl zugewiesen. Diese Zahl findet sich auch bei den Einstellungsmöglichkeiten der Lichtquellen wieder, welche dann auf die jeweilige Tischposition abgestimmt werden mussten. Abschließend wurde das Bild der Kamera durch drehen am Objektiv scharf gestellt.

Zur Vermessung der jeweiligen Untersuchungsobjekte (Nitrozellulosemembran, Zellen, Mäuse) wurde zuerst die Tür des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers geschlossen und darauf geachtet, dass die Lichtquellen für Infrarotlicht und Weisslicht aus, der Shutter für das Excitationslicht jedoch angeschaltet war. Im Softwareprogramm (Maestro 2.4.3) wurden nun die verwendeten Filter gewählt. Daraufhin wurde mittels der Funktion „Autoexpose Cube“ automatisch die optimale Belichtungszeit für die Untersuchungsobjekte bestimmt. Anschließend wurde über die Aktion „Acquire Cube“ die Sequenz der Bildaufnahme für die gewählten Wellenlängen gestartet. Die Gesamtheit der Bildersequenz bei verschiedenen Wellenlängen bezeichnet man als „Cube“.

Der Cube enthält alle Rohdaten, die von dem Untersuchungsobjekt (Nitrozellulosemembran, Zellen, Mäuse) gewonnen wurden. Diese Rohdaten konnten jetzt weiter bearbeitet werden. Sind alle Fluoreszenzfarbstoffe als Einzelspots im Bild enthalten, konnten die Spektren direkt über die Auswahl derselben im Cube festgelegt werden. Dazu wurde eine ROI (region of interest) in den Spot des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes gelegt. Die hier gemessenen Signalintensitäten bei den einzelnen Wellenlängen wurden nun vom Programm zu einem Spektrum zusammengefasst. Abbildung 20: zeigt die vom Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager für die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe erkannten Spektren. Diesen jeweiligen Spektren konnten dann zum einen noch die Bezeichnungen der Fluoreszenzfarbstoffe sowie bestimmte

Falschfarben zur besseren Kenntlichmachung zugewiesen werden. In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurden den Fluoreszenzfarbstoffen wenn nicht anders erwähnt folgende Falschfarben zugewiesen:

DY-505 = Blau

DY-682 = Rot

DY-782 = Grün

Bei den Bearbeitungen wurden den Autofluoreszenzen der jeweiligen Bilder die Farbe Schwarz zugewiesen.

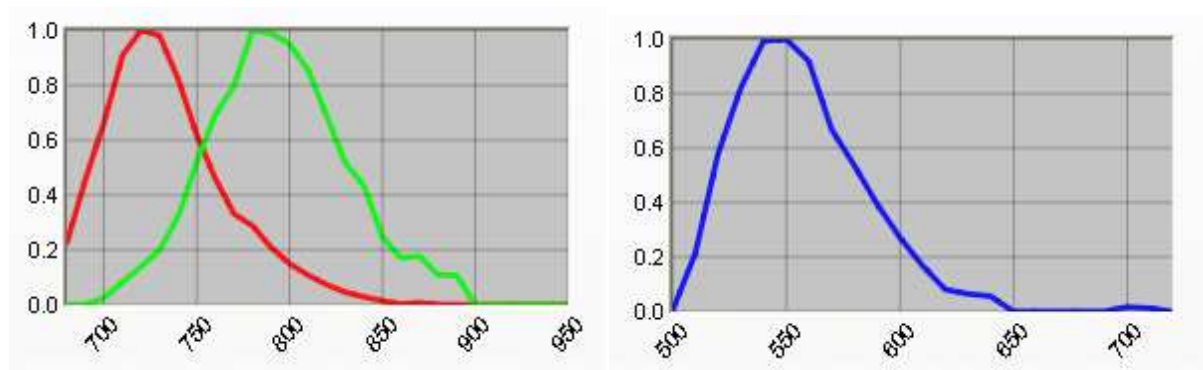


Abbildung 20: Abgebildet sind die mittels der Software Maestro 2.4.3 am MaestroTM-Kleintierimagers bestimmten Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 (Rot), DY-782 (Grün) und DY-505 (Blau). Die Spektren wurden hierbei zueinander normalisiert abgebildet. Die X-Achse gibt die Wellenlänge in nm an, die Y-Achse ist dimensionslos und gibt die normalisierte Emissionsintensität an (Maximum des jeweiligen Spektrum wurde 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu angeglichen). Die Spektren wurden vorher separat bestimmt, abgespeichert und für die späteren in vivo Versuche verwendet.

Sind nicht alle Fluoreszenzfarbstoffe im aktuellen Bild enthalten, wurden die Spektren vorher mittels spezieller Untersuchungsobjekte (Nitrozellulosemembran, Zellen, Mäuse), welche ausschließlich den jeweiligen Farbstoff enthalten, bestimmt. Die gewonnenen Spektren wurden dann als so genannte „spektral library“ (= Spektren Bibliothek) abgespeichert und konnten in das aktuelle Bild geladen werden.

Nachdem allen im Bild enthaltenen Spektren die entsprechenden Farben zugeordnet waren, wurden diese mittels der „Unmix“-Funktion aus dem Cube isoliert und voneinander getrennt. Dabei entstanden so genannte „component pictures“ (= Komponenten-Bilder). Diese enthalten Informationen wie Lokalisation und Signalintensität jeweils eines bestimmten Spektrums. In diesen „component pictures“ wurden mittels Vergabe von ROI's Messungen durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser semiquantitativen Auswertung wurde in dieser Arbeit stets das Durchschnittssignal / Belichtungszeit verwendet. Bei diesem Messwert

flossen bereits von Seiten des Programmes die Fläche des ROI's und die zur Aufnahme verwendete Belichtungszeit mit in die Werte ein. Die Messwerte verschiedener Messungen wurden somit vergleichbar. Die ermittelten Werte wurden über die AUC (Area under the curve = Fläche unter der Kurve) des jeweiligen Spektrums bestimmt und in a.u. ausgegeben.

Abbildung 21 zeigt ein Beispiel für die weitere Bearbeitung einer Nitrozellulosemembran mit den Fluoreszenzfarbstoffen DY-505 und DY-782 mittels der Maestro 2.4.3-Software.

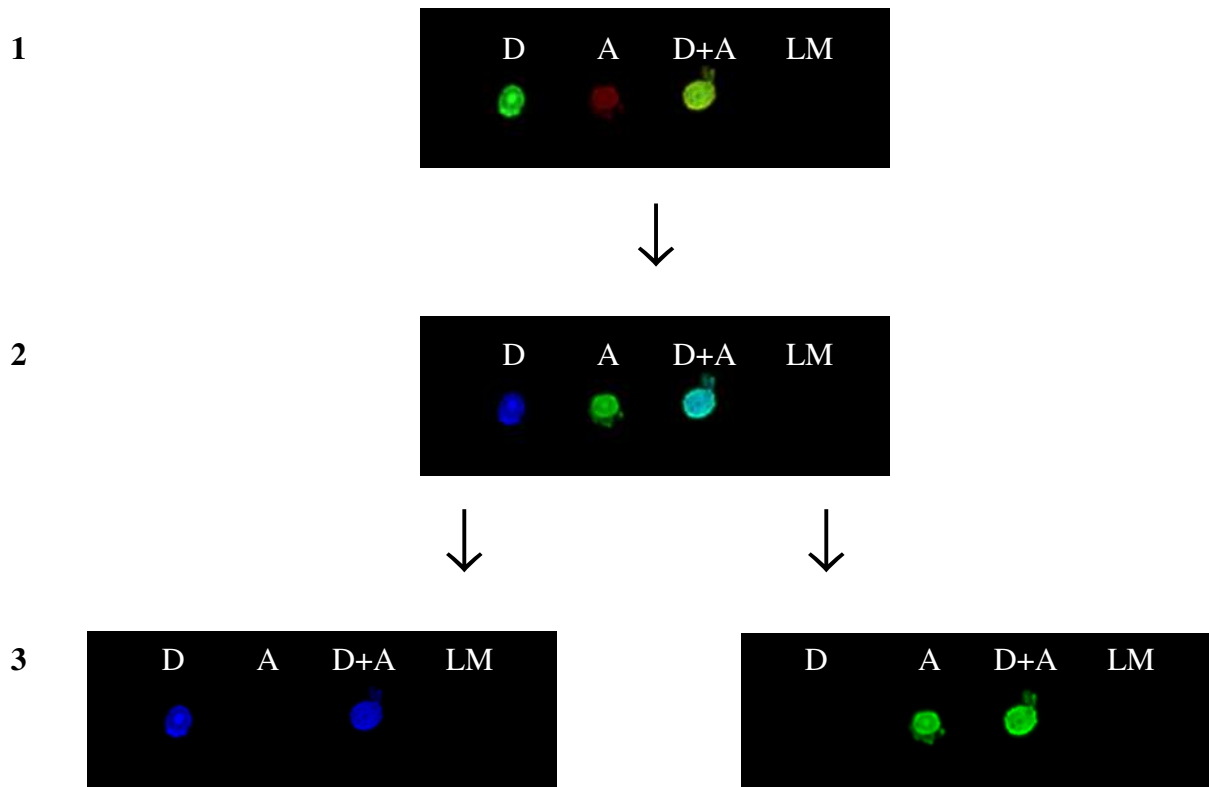


Abbildung 21: Beispiel für die Weiterbearbeitung eines von einer Nitrozellulosemembran mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager gewonnenen Fluoreszenzbildes mit Hilfe der Maestro 2.4.3-Software. Dargestellt sind die Bearbeitungsschritte eines so genannten Cubes (siehe Text Seite 36) mit dem Farbstoffpaar DY-505/DY-782 (DY-505 als Donor und DY-782 als Akzeptor). Hier diente als Untersuchungsobjekt eine mit dem oben genannten Farbstoffpaar bearbeitete Nitrozellulosemembran. Nach Justierung der Kamera wurde hier das Multifiltersetting BLUE-DEEPRED gewählt und nach automatischer Bestimmung der Belichtungszeit mittel „Acquire Cube“ die Aufnahme gestartet. Das von der Maestro 2.4.3-Software erstellte Originalbild (1) wurde dann weiter bearbeitet. Dabei wurde den im Originalbild enthaltenen Spektren von Donor und Akzeptor bestimmte Falschfarben zugewiesen. In diesem Fall wurde dem Farbstoff DY-505 die Farbe Blau und dem Farbstoff DY-782 die Farbe Grün zugewiesen. Dadurch entstand nach dem „Unmix“-Vorgang, bei dem die Spektren aus dem Gesamtbild isoliert und ihnen die vorher bestimmten Falschfarben zugewiesen werden, das Bild 2. In diesem sind nun beide Fluoreszenzfarbstoffe DY-505 und DY-782 mit den für sie verwendeten Falschfarben dargestellt. Das Bild 2, welches die Signale beider Fluoreszenzfarbstoffe zusammen enthält, kann dann noch in die beiden Einzelbilder (3) zerlegt werden. In diesen werden nur der jeweils ausgewählte Farbstoff dargestellt (links: DY-505; rechts: DY-782). D = Donor; A = Akzeptor; LM = Lösungsmittel

### 3.4.3. Allgemeiner Umgang mit Zellen der J774-Reihe

Für den Umgang mit Zellen sind besondere Verfahrensweisen nötig. Es soll damit sowohl ein optimales Wachstum gewährleistet, als auch jede Kontamination der Kulturen vermieden werden. Im Folgenden werden diese Verfahrensweisen näher beschrieben.

#### 3.4.3.1. Auftauen der Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden zuerst die Kryotubes mit den eingefrorenen Zellen aus der Stickstofftonne entnommen und im Wasserbad bei 37 °C langsam aufgetaut.

Die aufgetauten Zellen wurden nun unter die Werkbank gebracht. Der Inhalt des Kryotubes wurde in einen Falcontube gefüllt und dieser auf 10 ml mit Nährmedium aufgefüllt. Anschließend wurde der Falcontube bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit neuem Nährmedium suspendiert. Die entstandene Suspension wurde nun in eine Zellkulturflasche gefüllt und diese mittels Nährmedium auf das für sie entsprechende Volumen (Klein: 5 ml; Mittel: 15 ml; Groß: 30 ml) aufgefüllt. Die Zellkulturflasche wurde anschließend beschriftet und im Brutschrank für 2 – 3 Tage inkubiert damit die Zellen gut anwachsen konnten. Anschließend wurden sie mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und der erste Mediumwechsel durchgeführt (siehe 2.4.3.2. *Mediumwechsel*)

#### 3.4.3.2. Mediumwechsel

Verwendete Lösungen:                    DMEM + 10% FKS

Ein regelmäßiger Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage ist notwendig um den Zellen ausreichend Nährstoffe für ihr Wachstum zur Verfügung zu stellen.

Dieser Mediumwechsel wurde unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Dafür musste diese vor Beginn der Arbeiten mit 70%igem Ethanol ausgesprüht werden. Alle Materialien oder Substanzen, welche unter der Werkbank benötigt wurden, wurden vorher ebenfalls mit 70%igem Ethanol abgesprüht. Eine Einschleppung von Keimen aus der Umgebung konnte somit vermieden werden. Nachdem alle Materialien und Substanzen vorbereitet waren, wurde die Zellkultur aus dem Brutschrank heraus genommen und die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Wachstum und eventuelle Kontamination hin kontrolliert. Die

Zellkulturflasche durfte beim Transfer unter die Werkbank nicht mit 70%igem Ethanol abgesprüht werden, da diese einen Luftfilter besitzt über welchen das Ethanol in die Flasche eindringen und die Zellen hätte abtöten können. Mittels einer Absaugung und einer daran angeschlossenen Pasteurpipette wurde das alte Medium abgesaugt. Ein je nach Größe der Zellkulturflasche unterschiedliches Volumen des neuen Mediums wurde anschließend hinzugegeben. Kleine Flaschen wurden mit 5 ml, mittlere mit 15 ml und große Flaschen mit 30 ml Medium befüllt. Nach Beendigung der Arbeiten wurde die Zellkulturflasche wieder im Brutschrank gelagert und die Werkbank abschließend mit 70%igem Ethanol gesäubert.

### 3.4.3.3. Passagieren

Verwendete Lösungen:           DMEM + 10% FKS  
                                     Hank's BSS

Einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Dies war notwendig, damit den Zellen stets ausreichend Platz für ihr Wachstum zur Verfügung stand.

Zu Beginn wurden zwei CASY-Kapillarmessgefäße mit jeweils 10ml CASY@ton befüllt. Dazu musste die Flüssigkeit durch einen Filter hindurch gepresst werden um somit alle Kristalle aus der Lösung zu entfernen. Ansonsten hätten diese die späteren Messungen verfälscht.

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Werkbank wurde vor Beginn der Tätigkeiten mit 70%igem Ethanol gereinigt. Alle Materialien, welche mit unter die Werkbank genommen wurden, waren vorher mit 70%igem Ethanol abgesprüht wurden um so eine Keimverschleppung unter die Werkbank zu verhindern. Die Zellkulturflasche wurde dabei jedoch nicht abgesprüht, da durch den Luftfilter das Ethanol eindringen und die Zellen hätte abtöten können. Schließlich wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit Hank's BSS gewaschen, wobei jedes Mal das zugegebene BSS abgesaugt wurde. Schließlich wurden 2 ml Medium zugegeben. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen vom Untergrund gelöst und anschließend weitere 8 ml Medium zugegeben. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen aus einer Pipette ausreichend suspendiert. Nachdem eine homogene Flüssigkeit entstanden war, wurde diese in ein Falconröhrchen gegeben. Aus diesem wurden 25 µl abgenommen und in eines der vorbereiteten CASY-Kapillarmessgefäße gegeben. Dieses wurde durch zweimaliges Schwenken ausreichend gemischt und anschließend diese

Flüssigkeit am CASY-Zellzähler vermessen. Das Gerät wurde danach mit reinem CASY®ton gespült. Aus der bestimmten Zellzahl wurde das für eine neue Zellkulturflasche benötigte Volumen an Zellsuspension errechnet. Für kleine Flaschen wurden  $3 \times 10^5$  Zellen, für mittlere  $2 \times 10^6$  Zellen und für große  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt. Das errechnete Volumen wurde in die neue Zellkulturflasche gegeben. Anschließend wurde die Flasche mit neuem Medium auf das für sie optimale Mediumvolumen aufgefüllt (Kleine: 5 ml, Mittlere: 15 ml; Große: 30 ml). Die neue Zellkulturflasche wurde dann mit Zelllinie, Passage, ausgesäter Zellzahl, Datum und Namen des Verwenders beschriftet und anschließend im Brutschrank platziert. Der Rest der Zellsuspension wurde abgesaugt und die Werkbank mit 70%igem Ethanol gesäubert.



Abbildung 22: Dargestellt sind verschiedene Zellkulturflaschen befüllt mit Makrophagen der Zelllinie J774 nach Passagieren. Diese Zellkulturflaschen wurden beschriftet mit dem Namen der Zelllinie (J774), der Passage, der Ausgesäten Zellzahl, dem Datum der Anlage der Flasche und dem Namenskürzel des Verwenders.



### 3.4.4. Zellversuche

Nachfolgend sollen die mit den Makrophagen der J774-Reihe durchgeführten in vitro Versuche beschrieben werden.

#### 3.4.4.1. Internalisierungsversuche mit Zellkulturflaschen

Verwendete Lösungen:           Hank's BSS  
  DMEM + 10% FKS

Um ausreichend inkubierte Zellen zu erhalten, welche mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen werden können, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen inkubiert. Dazu wurden an den ersten beiden Versuchtagen pro Tag jeweils auf 18 kleine Zellkulturflaschen 550.000 Zellen pro Flasche (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) ausgesät. Diese wurden dann 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem die Zellen für 2 Tage ausreichend angewachsen waren, wurde zunächst für den freien Farbstoff eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20 nmol/μl und für den IgG-gekoppelten Farbstoff eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,2 nmol/μl hergestellt. Anschließend wurde das Medium aus den Flaschen abgesaugt und der Zellrasen dreimal mit Hank's BSS gewaschen. Danach wurden jeweils 3 Flaschen mit einem definierten Volumen einer vorher unter der Werkbank hergestellten Lösung der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe befüllt (siehe Tabelle 5). Dabei wurden die Flaschen, welche freien Farbstoff erhielten, am 3. Versuchtag und die, welche den mit IgG-gekoppelten Farbstoff erhielten, am 4. Versuchtag behandelt. Zusätzlich wurden für jede Messreihe 3 Flaschen mit reinem Medium befüllt und zur Kontrolle mitgeführt. Nach dem Behandeln der Zellkulturflaschen wurden diese für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nachdem die Zellen einen Tag im Brutschrank inkubiert waren, wurde der Zellrasen unter dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet. Anschließend wurde damit begonnen die Zellen aus den Zellkulturflaschen zu ernten.

## SUBSTANZEN, GERÄTE, MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 5: Verhältnisse für die Befüllung der verschiedenen Zellkulturflaschen sowie die entstandenen Endkonzentrationen für jeden Farbstoff

Fluoreszenzfarbstoff	Verwendete Menge an Fluoreszenzfarbstoff Stammlösung [µl]	Zugegebene Menge an Medium [µl]	Fluoreszenzfarbstoffkonzentration der Gebrauchslösung in [µmol/µl]
DY-505	3,75	4996,25	15
DY-682	3,75	4996,25	15
DY-782	3,75	4996,25	15
DY-505/DY-782	3,75 von jedem	4992,50	15
DY-682/DY-782	3,75 von jedem	4992,50	15
DY-505-IgG	30,00	4970,00	1,2
DY-682-IgG	30,00	4970,00	1,2
DY-782-IgG	30,00	4970,00	1,2
DY-505-IgG/DY-782-IgG	30,00 von jedem	4940,00	1,2
DY-682-IgG/DY-782-IgG	30,00 von jedem	4940,00	1,2

Dabei wurde bis auf wenige Unterschiede nach demselben Prinzip vorgegangen wie bereits unter 2.4.3.3. *Passagieren* beschrieben. Abweichend davon war die Tatsache, dass vor dem Absaugen der Überstände und nach dem letzten Waschvorgang jeweils 2 ml der Flüssigkeit aus jeder Zellkulturflasche abgenommen und in Cups gefüllt wurde. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels CASY-Zellzähler wurde in einen Falcontube eine Menge von  $2 \times 10^6$  Zellen gefüllt. Die restlichen Zellen wurden für die Vermessung mittels CLSM weiterverarbeitet (siehe dazu 2.4.4.2. *CLSM-Vermessung der Makrophagen*).

Die in die neuen Falcontubes umpipettierten Zellen wurden dann bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 200 µl Medium erneut gelöst. Diese 200 µl wurden dann in einen 500 µl Cup gegeben. Die so befüllten Cups wurden anschließend erneut bei 200 g für 5 min zentrifugiert und der entstandene Überstand wiederum abpipettiert. Das im Cup zurückgebliebene Zellpellet wurde abschließend mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Hinterher wurden auch die abgenommenen Überstände vor und nach dem Waschen im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Verwendet wurden hierbei für die Gruppe DY-682/DY-782 die RED-Filter-

Kombination und für die Gruppe DY-505/DY-782 zur Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 die BLUE-Filter-Kombination und zur Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 die BLUE-RED-Filter-Kombination.

### 3.4.4.2. CLSM-Vermessung der Makrophagen

In 2.4.4.1. *Internalisierungsversuche mit Zellkulturflaschen* wurde bereits das Verfahren zur Internalisierung von Fluoreszenzfarbstoffen durch die Makrophagen der J774-Zelllinie beschrieben. In diesem Schritt wurden auch die Zellen für die weitere Vermessung mittels CLSM gewonnen. Diese Makrophagen wurden zur Vermessung am CLSM auf Chamber-Slides fixiert. Dazu wurden die Zellen nach dem in Abbildung 23 dargestellten Schema auf die Chamber-Slides gegeben. Die Zellen wurden dann für 24 h im Brutschrank gelagert, damit sie auf der Oberfläche der Slides anwachsen konnten. Danach wurde unter der sterilen Werkbank weiter gearbeitet. Der Überstand in den Slides wurde abpipettiert und der Zellrasen dreimal mit Hank's BSS gewaschen. Anschließend wurde Aceton auf die Zellen gegeben und diese für 10 min auf Eis gelagert. Die Zellen konnten so auf den Slides fixiert werden. Schließlich wurde das Aceton abpipettiert und die Zellen erneut dreimal mittels Hank's BSS gewaschen. Danach wurde in eine der Reihen pro Well ein Volumen von 50 µl Hoechst-Farbstoff ( $c = 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) zugegeben und lichtgeschützt für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem Hoechst-Farbstoff wurde der Zellkern der Makrophagen angefärbt. Nun wurde erneut dreimal mit Hank's BSS gewaschen, der Wellaufsatz der Slides entfernt und das System für 30 min lichtgeschützt zum Trocknen abgestellt. Abschließend wurden die Slides mittels Permafluor und eines Deckgläschens eingebettet.

Die so fixierten Zellen wurden am CLSM vermessen. Vor jeder Messung wurde ein Nativ-Bild der Zellen erstellt. Danach wurden die zu untersuchenden Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. Dazu wurde zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 und DY-782 ein Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm verwendet. Detektiert wurden diese mit einem 650 nm longpass Filter. Zur Darstellung des Hoechst-Farbstoffes wurde eine Kombination aus einem Laser mit einer Wellenlänge von 365 nm zur Anregung und einem 450 nm longpass Filter zur Detektion verwendet. Anschließend wurden das Nativ-Bild sowie das Bild des Fluoreszenzfarbstoffs als auch des Hoechst-Farbstoffes übereinander gelegt.

## SUBSTANZEN, GERÄTE, MATERIAL UND METHODEN

---

	Medium	DY-505	DY-682	DY-782	DY-682 / DY-782	DY-505 / DY-782
	Medium	DY-505- IgG	DY-682- IgG	DY-782- IgG	DY-682- IgG / DY- 782-IgG	DY-505- IgG / DY- 782-IgG

Abbildung 23: Dargestellt ist das Schema für die Verteilung der inkubierten Zellen auf den Chamber Slides. Links wurden dabei jeweils nur mit Medium behandelte Zellen zur Kontrolle platziert. Anschließend wurden in je zwei Reihen jeweils die mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelten Makrophagen aufgetragen. Es wurden in der oberen Reihe Zellen, welche mit freiem Fluoreszenzfarbstoff behandelt wurden, und in der unteren Reihe Zellen, welche mit dem IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff behandelt wurden, aufgetragen

### 3.4.5. Tierversuche

Im Folgenden sind die durchgeführten in vivo Experimente beschrieben. Jeder Eingriff an den Mäusen erfolgte dabei unter vorherigem Einsatz von Isofluran zur Narkotisierung der Mäuse.

#### 3.4.5.1. Untersuchung von Fluoreszenz und FRET nach s.c. Applikation von inkubierten Zellen

Verwendete Lösungen:        DMEM + 10%FKS  
                                     Hank's BSS

Zunächst wurden auf 9 große Zellkulturflaschen jeweils  $1,5 \times 10^7$  Zellen ausgesät. Diese Flaschen wurden danach für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde den Flaschen jeweils 10 nmol IgG-gekoppelter Farbstoff ( $c = 2 \text{ nmol/ml}$ ) zugesetzt (Gesamtvolumen Fluoreszenzfarbstoffe + Medium = 5 ml je Flasche). Dabei wurden Ansätze für DY-505, DY-505/DY-782, DY-682, DY-682/DY-782, DY-782 sowie ohne Farbstoff hergestellt. Diese wurden nun für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden danach passagiert und deren Zellzahl bestimmt. Von jeder Flasche wurden  $1,5 \times 10^7$  Zellen in einen neuen Falcontube gegeben. Die Tubes wurden dann bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert. Eine Box wurde mit Eis vorbereitet und in dieser eine Flasche Matri-Gel gelagert, da dieses ohne Kühlung fest wird. Das übriggebliebene Zellpellet wurde in 100 µl Matri-Gel gelöst und auf eine Spritze aufgezogen. Das Matri-Gel sollte bewirken, dass sich unter der Haut der Tiere ein festes Pellet bildet, in welchem die Zellen verweilen. Die vorbereiteten Spritzen wurden ebenfalls auf Eis gelagert. Die Mäuse wurden am Vortag auf dem Rücken großflächig rasiert. Dies war nötig um das stark autofluoreszierende Fell zu entfernen und somit Störungsquellen für die spätere Vermessung zu vermeiden. Vor der Implantation der Zellen wurden diese durch auf und ab bewegen des Kolbens der Spritze noch einmal gut vermischt. Den Mäusen wurden die mit Farbstoff behandelten Zellen subcutan an verschiedene Stellen auf dem Rücken nach dem in Abbildung 24 dargestellten Schema implantiert. Danach wurden die Mäuse im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Verwendet wurden hierbei für die Gruppe DY-682/DY-782 die RED-Filter-Kombination und für die Gruppe DY-505/DY-782 zur Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 die BLUE-Filter-Kombination und zur Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 die BLUE-RED-Filter-Kombination.

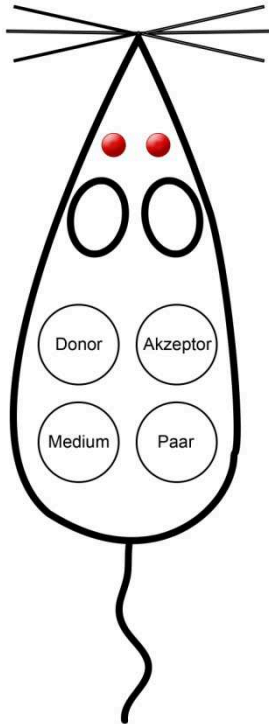


Abbildung 24: Schema für die Implantation der mit Fluoreszenzfarbstoff inkubierten Makrophagen in den Rücken der Versuchstiere.

### 3.4.5.2. Untersuchung von FRET am Ödemmodell

Verwendete Lösungen: 1x PBS (siehe 2.1.2. *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen*)  
Zymosan 1%ig (siehe 2.1.2. *Zusammensetzung der verwendeten Lösungen*)

Das hier Verwendung findende Ödem-Modell mittels Zymosan wurde bereits unter 1.3. *Darstellung von Protein-Interaktionen mittels FRET* beschrieben.

Für die in vivo Versuche wurden vorher wie in 2.4.1. *Herstellung der Sonden* IgG-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe hergestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden vor Einsatz verdünnt. Dabei wurden die Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 und DY-782 dreifach und der Farbstoff DY-505 zweifach verdünnt. Die Ausgangs- sowie Endkonzentrationen der eingesetzten Farbstofflösungen und deren DY/Protein-Ratio's der Fluoreszenzfarbstoffe sind aus Tabelle 6 zu entnehmen.

## SUBSTANZEN, GERÄTE, MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6: Konzentrationen und DY-Protein-Ratios der bei den in vivo Versuchen eingesetzten verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

<b>Farbstoff</b>	<b>Konzentration der Ausgangslösungen in nmol/μl</b>	<b>Konzentration der Endlösungen in nmol/μl</b>	<b>DY-Protein-Ratio</b>
DY-505	0,1081	0,0541	1,954
DY-682	0,1645	0,0548	1,945
DY-782	0,1359	0,0453	1,234

Die Mäuse wurden wie in Tabelle 7 angegeben in verschiedene Gruppen eingeteilt und dann an verschiedenen Tagen behandelt. Dabei wurden pro Gruppe 4 Tiere verwendet.

Tabelle 7: Aufteilung der Mäuse in die verschiedenen Gruppen und deren Verwendungszweck

<b>Gruppe</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Nativ	Negativkontrolle
Zymosan	Negativkontrolle
Zymosan+DY-682	Darstellung Donor der FRET-Paars Allein
Zymosan+DY-782	Darstellung Akzeptor des FRET-Paars und Kontroll-Paars Allein
Zymosan+DY-682+DY-782	Darstellung von Donor und Akzeptor des FRET-Paars als Paar
Zymosan+DY-505	Darstellung des Donors des Kontroll-Paars Allein
Zymosan+DY-505+DY-782	Darstellung von Donor und Akzeptor des Kontroll-Paars im Paar

Es wurde eine 1%ige Zymosan-Lösung verwendet um am rechten Ohr der Maus das Ödem hervorzurufen. Den Mäusen wurde am Vortag der Hinterkopf rasiert damit beide Ohren frei lagen. Am Versuchstag wurden die Mäuse gewogen und anschließend unbehandelt im Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen um Nativaufnahmen zu erhalten. Anschließend wurde ihnen 20 µl Zymosan subcutan ins rechte Ohr injiziert und die Mäuse erneut vermessen. Pro Maus wurde eine Farbstoffmenge von 55 nmol/kg Körpergewicht verwendet. Je nach Gewicht der Maus wurde die notwendige Menge an Farbstofflösung aufgezoogen ( $45 \pm 5$  µl je Maus) und ihr dann über die Schwanzvene appliziert. Der Nativ- und der Zymosan-Gruppe wurde ein äquivalentes Volumen PBS verabreicht. Es wurden daraufhin Messungen zu den Zeiten 0 (direkt nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes), 2, 4 und 6 Stunden angefertigt. Vor jeder Aufnahme wurde ein Weißlicht-Bild angefertigt. Nach den 6 Stunden wurden die Mäuse mittels CO<sub>2</sub> abgetötet.



### 4. Ergebnisse

#### 4.1. FRET-Eigenschaften der Sonden

Es erfolgt nun eine Charakterisierung der Sonden mittels verschiedener Darstellungen der Fluoreszenzfarbstoff-Paare. Dabei im Besonderen die Gegenüberstellungen von FRET-Paar und Kontroll-Paar sowie IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff um deren Verhalten als Einzel-Fluoreszenzfarbstoffe sowie als Donor-Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff-Paar zu ermitteln.

##### 4.1.1. Gegenüberstellung des FRET-Paares und Kontroll-Paares auf einer Nitrozellulosemembran

Die wie im Methodenteil beschrieben (siehe 2.4.2.1. *Nachweis von FRET nach Fixierung der Sonden auf Nitrozellulosemembran*) auf Nitrozellulosemembran vermessenen Fluoreszenzfarbstoff-Paare DY-682/DY-782 und DY-505/DY-782 werden im Folgenden miteinander verglichen.

Abbildung 25 zeigt dabei die Bearbeitungsschritte bei der Auswertung der aufgenommenen Cubes. Unter Abbildung 25, A sind dabei die „Unmix“-Bilder und unter Abbildung 25, B die isolierten Einzel-Spektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt. Die Diagramme der semiquantitativen Auswertung dieser Einzel-Signalintensitäten sind unter Abbildung 25, C dargestellt. Abgebildet ist dabei für jedes Fluoreszenzfarbstoff-Paar ein eigenständiges Diagramm. In diesem sind die Signalintensitäten von Donor und Akzeptor jeweils allein und im Paar eingetragen sowie die ermittelten Standardabweichungen der Mittelwerte.

Die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe ließen sich dabei exakt voneinander trennen. In den Einzelbildern ist gut zu sehen, dass die Fluoreszenzfarbstoffe keine Signale in den jeweils anderen Spots liefern.

Für das FRET-Paar DY-682/DY-782 zeigen die Bilder eine Änderung der Fluoreszenz der Farbstoffe. Der Farbstoff DY-682 zeigt hier im Einzel-Spot eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität als im Paar-Spot. Nach Quantifizierung des Signals wird dieser Unterschied in den erstellten Diagrammen deutlich sichtbar. Das DY-682-Signal nimmt in seiner Intensität stark ab. Es fällt dabei von etwa 0,55 a.u. auf etwa 0,24 a.u. ab. Somit kommt es zu einer Verringerung des Signals um etwa den Faktor 2.

Beim Farbstoff DY-782 zeigen die Bilder eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensitäten vom Einzel-Spot zum Paar-Spot. Nach Quantifizierung des Signals zeigt sich im Diagramm, dass das DY-782-Signal von 0,009 a.u. auf 0,075 a.u., etwa um den Faktor 8, ansteigt.

Aufgrund des Einsatzes des Multi-Filter-Settings bei der Vermessung des Kontroll-Paares DY-505/DY-782 wird das DY-782-Signal trotz deutlich geringer Fluoreszenz gegenüber dem DY-505-Signal im Bild gleich stark dargestellt. In den Bildern wird jedoch sehr gut deutlich, dass sich die Floreszenzen der Einzel-Spots kaum von den Floreszenzen der Paar-Spots unterscheiden. Das DY-505-Signal ändert seine Fluoreszenzintensität nur geringfügig und steigt dabei von 1,52 a.u. auf 1,71 a.u.. Das DY-782-Signal ändert sich nicht. Es bleibt konstant bei 0,02 a.u.. Im Diagramm ist auch das tatsächliche Verhältnis der Signalintensitäten gut zu erkennen. Man sieht, dass der Farbstoff DY-782 nur ein sehr geringes Signal liefert während beim Farbstoff DY-505 ein deutlich stärkeres Signal aufgefangen werden kann.

Die Änderungen der Signalintensitäten von Donor und Akzeptor im Vergleich zwischen FRET-Paar und Kontroll-Paar zeigen sich noch einmal sehr deutlich in Abbildung 26. Hier wurde das Verhältnis (später auch Ratio genannt) aus der Signalintensität des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes im Paar sowie allein bestimmt und der Wert des Quotienten errechnet ( $\text{Signal im Paar} / \text{Signal Allein}$ ). Dabei zeigen sich noch einmal sehr deutlich die Änderungen der Signalintensitäten von Donor und Akzeptor der beiden Gruppen. Während das DY-682-Signal aus der Gruppe DY-682/DY-782 auf 43% seiner Signalstärke im Einzelspot fällt, bleibt das 505-Signal aus der Gruppe DY-505/DY-782 mit 112% Signalstärke seines Einzelspot-Signals konstant. Das 782-Signal aus der Gruppe DY-682/DY-782 steigt auf 818% seiner Signalstärke im Einzelspot. Hingegen bleibt das 782-Signal aus der Gruppe DY-505/DY-782 mit 98% seiner Einzelspot-Signalstärke nahezu konstant.

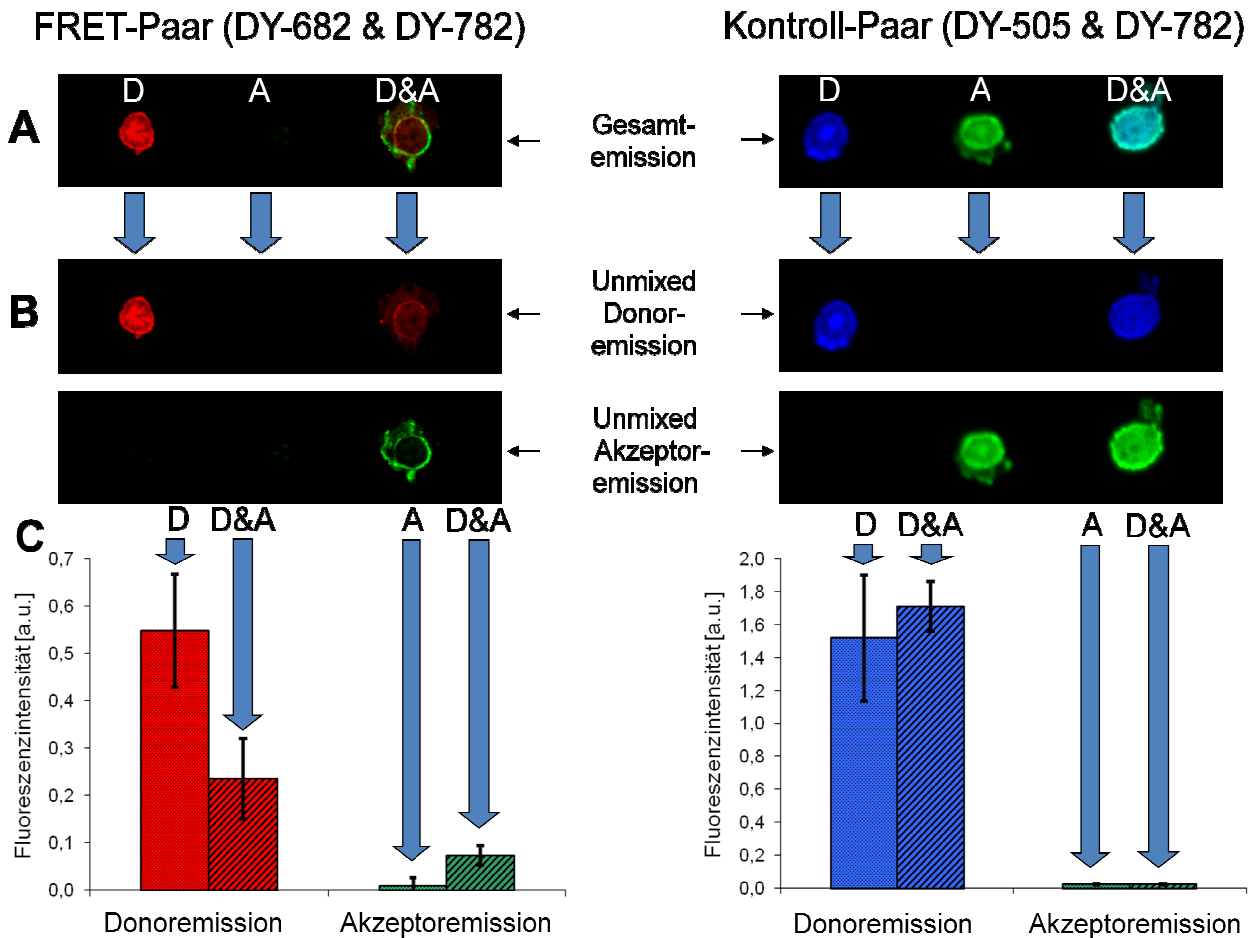


Abbildung 25: Gegenüberstellung von FRET-Paar und Kontroll-Paar nach Vermessung auf Nitrozellulosemembran. Dargestellt sind die Stufen der Signalverarbeitung. A zeigt das jeweilige Gesamtbild in dem sowohl Donor- als auch Akzeptorsignal enthalten sind. Dieses Bild wurde mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers von der Nitrozellulosemembran gewonnen. Verwendet wurde dabei für das FRET-Paar die RED-Filter-Kombination (Ex: 615-665 nm; Em: 700 nm longpass) und für das Kontroll-Paar ein BLUE-DEEPRED-Multifilter-Setting (Ex: 445-490 nm; Em-D: 515 nm longpass; Em-A: 750 nm longpass). Dabei wurde je Spot eine Stoffmenge von 0,2 nmol aufgetragen. B stellt die durch Trennung der Spektren in Donor und Akzeptor entstandenen Bilder jeweils nur eines Fluoreszenzfarbstoffes dar. In Schritt C wurden die aus den unter B gezeigten Bildern gewonnenen Messwerte in Diagrammen dargestellt. Dabei entspricht die Farbe im Diagramm der den Fluoreszenzfarbstoffen zugeordneten Falschfarbe in den Bildern. Die Messwerte stellen die Area under the curve (AUC; Fläche unter der Kurve) des jeweiligen Spektrums dar. Eingetragen sind die Mittelwerte der vermessenen Pixel sowie deren Standardabweichung. Eine ROI umfasste dabei im Mittel 2000 Pixel bei etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. (D = Donor; A = Akzeptor; D&A = Donor und Akzeptor; Ex: Excitationsfilter; Em: Emissionsfilter)

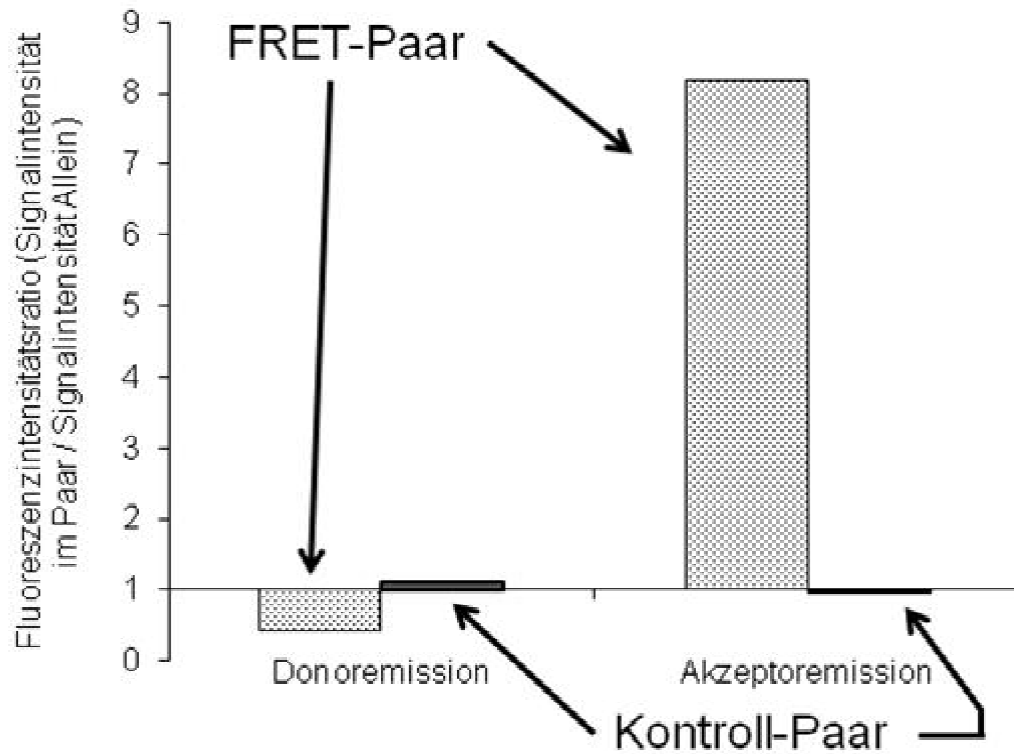


Abbildung 26: Vergleich der Ratio (Signalintensität im Paar / Signalintensität Allein) von FRET-Paar und Kontroll-Paar. Im oberen Diagramm wurde eine Ratio zwischen dem jeweiligen Donor und Akzeptor Allein und in Anwesenheit des jeweils anderen Fluoreszenzfarbstoffes errechnet (Allein / Im Paar) und dann aufgetragen. Die X-Achse wurde dabei auf  $Y = 1$  verschoben. Ein Wert von  $Y = 1$  stellt keine Änderung der Signalintensitäten dar. Oberhalb der X-Achse kommt es zu einem Anstieg und unterhalb der X-Achse zu einem Abfall der Signalintensität im Paar im Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff allein.

### 4.1.2. Vergleich der Signalintensität zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff

Hier erfolgt nun ein Vergleich der Signalintensitäten von IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff. Die wie in 2.4.2.2. *Parallele Darstellung von IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff* beschrieben gewonnenen Daten sind in den verschiedenen Bearbeitungsschritten der Auswertung mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers in Abbildung 27 dargestellt. A zeigt dabei das gewonnene Gesamt-Bild der Nitrozellulosemembran. Nach Aufteilung des Gesamt-Bildes in die jeweiligen Signale der Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 und DY-782 entstanden die Bilder unter B. Die hierin enthaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden nach semiquantitativer Auswertung im Diagramm unter C dargestellt.

Es zeigt sich das die beiden Fluoreszenzfarbstoffe sehr exakt nebeneinander dargestellt werden können, ohne dass es ein Signal des einen Fluoreszenzfarbstoffes in den Spots des anderen Fluoreszenzfarbstoffes gibt. Es lassen sich also auch die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe fehlerfrei nebeneinander darstellen. Ebenso ist in den Bildern zu erkennen, dass die Fluoreszenz der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe größer ist als die der freien Fluoreszenzfarbstoffe.

Dieser Unterschied bestätigt sich nach semiquantitativer Auswertung der Signalintensitäten im dargestellten Diagramm. Das DY-682-Signal steigt dabei von 0,15 a.u. des freien Fluoreszenzfarbstoffes auf 0,48 a.u. des IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes. Das Signal steigt damit um den Faktor 3 an.

Das DY-782-Signal steigt von 0,018 a.u. durch den freien auf 0,056 a.u. durch den IgG-gekoppelten Farbstoff. Somit steigt das Signal ebenfalls um den Faktor 3 an.

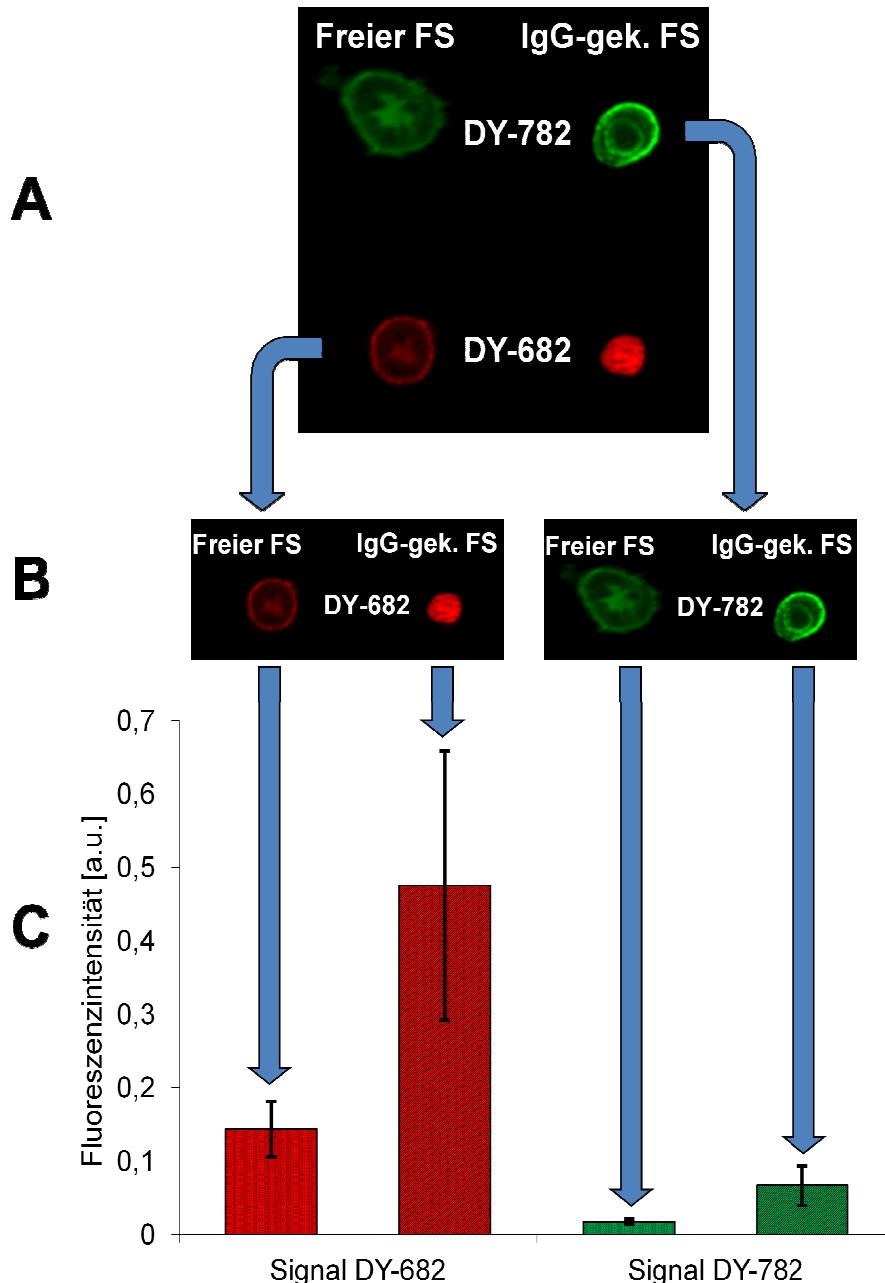


Abbildung 27: Vergleich der Signalstärke zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff. Dargestellt sind die Stufen der Signalverarbeitung. A zeigt das jeweilige Gesamtbild in dem sowohl freier als auch IgG-gekoppelter Farbstoff DY-682 und DY-782 enthalten sind. Dieses Bild wurde mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers von der Nitrozellulosemembran gewonnen. Dabei wurde je Spot eine Stoffmenge von 0,2 nmol aufgetragen. Verwendet wurde ein Multifilter-Setting bestehend aus RED-Filter (Ex: 615-665 nm; Em: 700 nm longpass) für DY-682 und NIR-Filter (Ex: 710-760 nm; Em: 800 nm longpass) für DY-782, B stellt die durch Trennung der Spektren in die beiden Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 und DY-782 entstandenen Bilder dar. In Schritt C wurden die aus den unter B gezeigten Bildern gewonnenen Messwerte in einem Diagramm dargestellt. Dabei entspricht die Farbe im Diagramm der den Fluoreszenzfarbstoffen im Bearbeitungsprozess zugewiesenen Falschfarben. Das gepunktete Muster steht für den freien Farbstoff und das Strichmuster für den IgG-gekoppelten Farbstoff. Die Messwerte stellen die Area under the curve (AUC; Fläche unter der Kurve) des jeweiligen Spektrums dar. Eingetragen sind die Mittelwerte und deren zugehörige Standardabweichungen. Die mittlere ROI-Größe betrug hier 2000 Pixel bei etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>

## ERGEBNISSE

---

Das errechnete Verhältnis zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff (Abbildung 28) zeigt noch einmal den Anstieg der Signalintensitäten bei gleicher Konzentration und Stoffmenge des Fluoreszenzfarbstoffes.

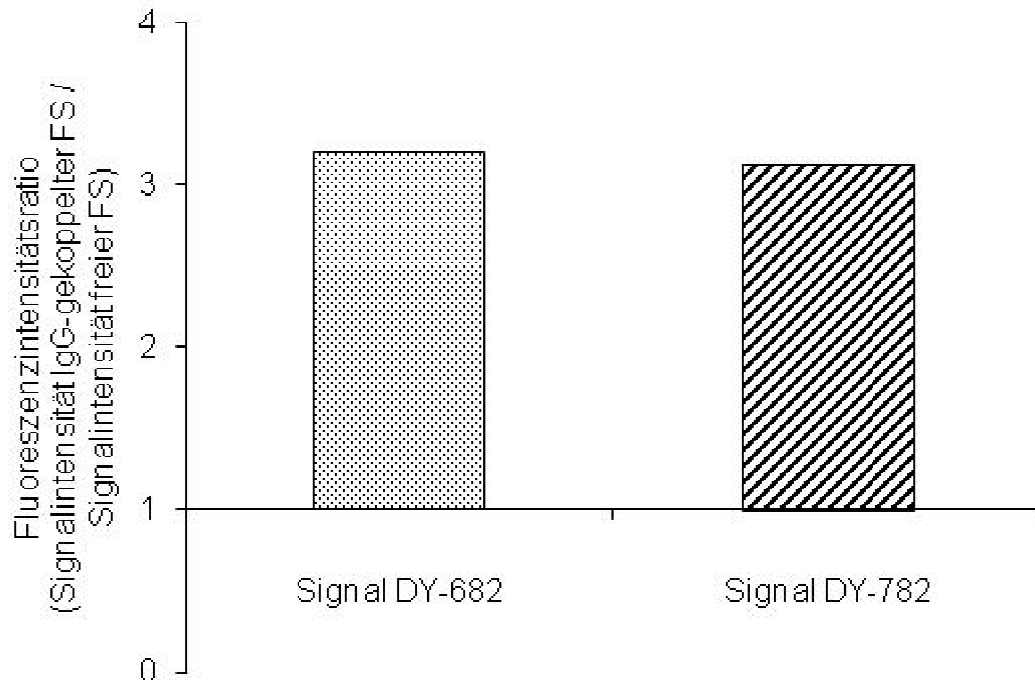


Abbildung 28: Darstellung der Fluoreszenzintensitätsratio von IgG-gekoppeltem Farbstoff und freiem Farbstoff der beiden Fluorophore DY-682 und DY-782. Errechnet wurde der Wert des Quotienten aus der Fluoreszenzintensität von IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff auf Grundlage der Werte des Diagrammes Abbildung 25, C. Die X-Achse wurde dabei auf  $Y = 1$  verschoben. Ein Wert von  $Y = 1$  stellt keine Änderung der Signalintensitäten dar. Oberhalb der X-Achse kommt es zu einem Anstieg und unterhalb der X-Achse zu einem Abfall der Signalintensität im Paar im Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff allein. Da es sich hier um einen repräsentativen Versuch handelt wurden keine Standardabweichungen ermittelt.

### 4.1.3. Untersuchung des Quenching-Effektes und der Detektionsgrenze

Die Ergebnisse der unter 2.4.2.3. *Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe in bestimmten Konzentrationsbereichen* beschriebenen Untersuchungen sind in Abbildung 29 dargestellt. Unter A sind dabei die Weiß-Bilder aufgeführt und unter B die ermittelten Fluoreszenzbilder. C zeigt die nach semiquantitativer Auswertung der Signalintensitäten erhaltenen Diagramme mit eingetragenen Standardabweichungen der Mittelwerte. Die Farben der Linien in den Diagrammen entsprechen den jeweiligen oben farblich markierten Reihen.

Die Bilder des freien Fluoreszenzfarbstoffes zeigen dabei, dass die stärkste Fluoreszenz bei einer Konzentration von 0,2345 nmol/μl zu finden ist. Bis dahin steigt die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes in allen drei Ansätzen an um danach wieder abzufallen (Abbildung 29, C). Man erkennt auch, sowohl in den Bildern aus Abbildung 29, B als auch aus den Diagrammen unter Abbildung 29, C, dass die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes sich je nach verwendetem Verdünnungsmittel unterscheidet. Dabei liefert der in DMF verdünnte Farbstoff die stärkste und der in Medium verdünnte die geringste Fluoreszenzintensität. Dieser Unterschied zwischen den Lösungsmitteln nimmt bis zum Punkt der maximalen Fluoreszenzintensität bei 0,2345 nmol/μl zu um dann wieder abzunehmen.

Beim IgG-gekoppelten Farbstoff nimmt die Fluoreszenz stetig über die Verdünnungen ab. Zu sehen sind nur die Ausgangskonzentration von 0,0116 nmol/μl und die erste Verdünnung von 0,0012 nmol/μl. Danach ist die Fluoreszenz sowohl optisch als auch mittels Quantifizierung am Gerät nicht mehr auszumachen. Ein Unterschied der Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Verdünnungsmitteln war nicht feststellbar.



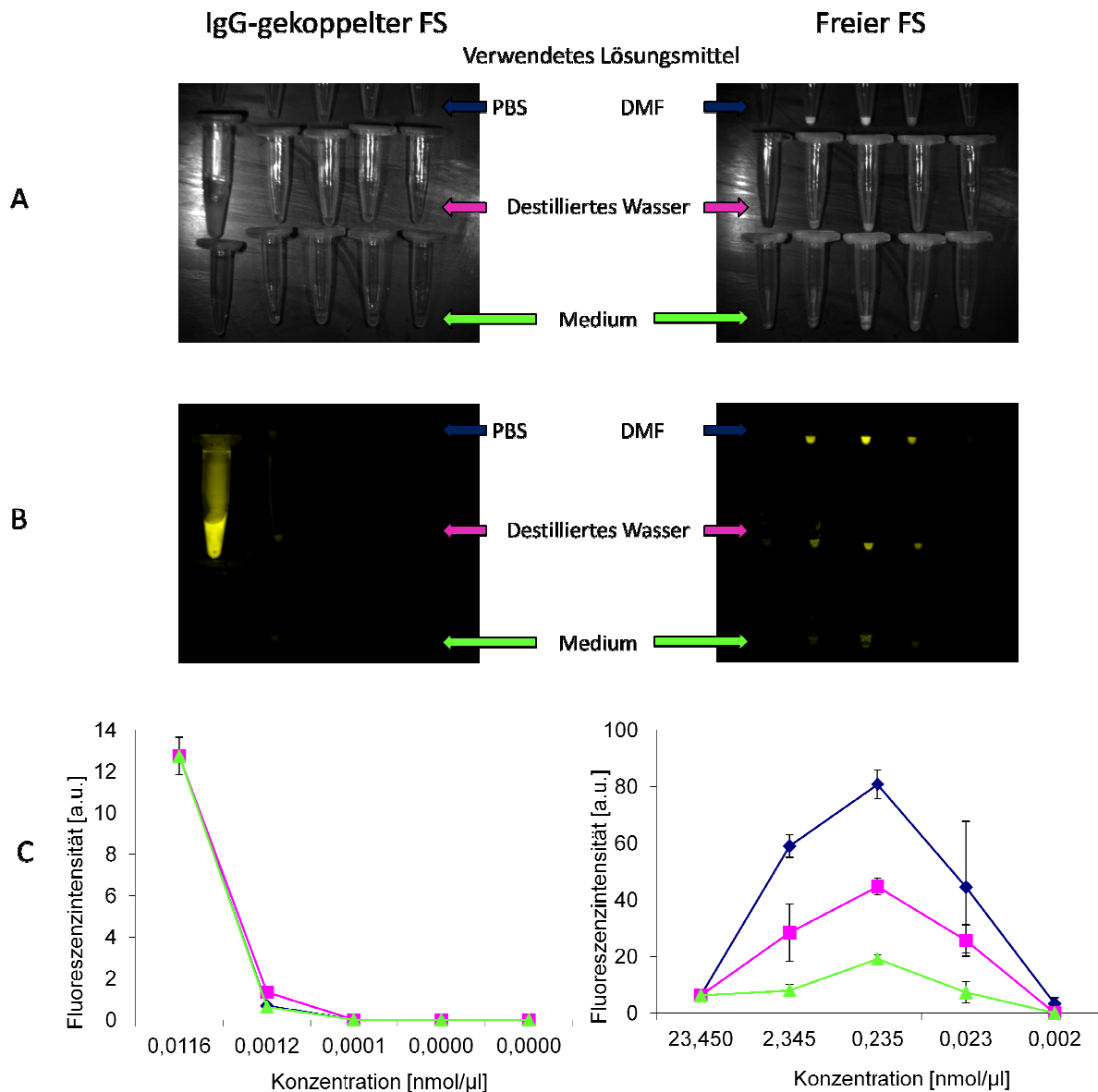


Abbildung 29: Darstellung des freien und des IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 in verschiedenen Verdünnungen. Das DY-682-Signal wurde hier Gelb dargestellt um einen besseren Kontrast zu geben. Zur Darstellung wurde die RED-Filter-Kombination (Exitationsfilter: 615-665 nm; Emissionsfilter: 700 nm longpass) verwendet. Die verschiedenen Reihen wurden mit jeweils unterschiedlichen Verdünnungsmitteln wie oben angegeben weiter verdünnt. In den Spalten befinden sich die Verdünnungen, wobei die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes jeweils von links nach rechts abnimmt. Unter C handelt es sich um eine semiquantitative Auswertung nach Vermessung der verschiedenen Spots. Die Größe der ROI's lag dabei im Mittel bei 350 Pixeln mit etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Die Farben in den Diagrammen entsprechen den Farben der Pfeile in den Bildern A und B. Eingetragen sind die jeweiligen Standardfehler der Messungen.

### 4.2. In vitro Nachweis der FRET-Sonden

#### 4.2.1. Nachweis der Fluoreszenz in Zellpellets

##### 4.2.1.1. Für den freien Fluoreszenzfarbstoff

Die wie in 2.4.4.1. *Internalisierungsversuche mit Zellkulturflaschen* gewonnenen Cups wurden mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Die ermittelten p-Werte wurden jeweils mittels eines zweiseitigen T-Testes für zwei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz ermittelt.

In der nachfolgend gezeigten Abbildung 30 sind die gewonnenen Bilder einer repräsentativen Versuchsreihe jeweils für das FRET- und das Kontroll-Paar dargestellt. Die mit Medium in Abwesenheit von Fluoreszenzfarbstoffen behandelten Zellen zeigen in allen Versuchsreihen keinerlei Fluoreszenz.

Beim FRET-Paar DY-682/DY-782 zeigen die Bilder, dass das DY-682-Signal allein gut zu sehen ist, während es im Paar kaum noch zu erkennen ist. Es kommt also zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz. Beim DY-782-Signal zeigt sich hingegen der umgekehrte Effekt. Die Fluoreszenz ist im Paar-Spot größer als im Einzel-Spot.

Die Bilder des Kontroll-Paares DY-505/DY-782 zeigen, dass sich die Fluoreszenz der Farbstoffe zwischen Einzel-Spot und Paar-Spot kaum unterscheidet. Es ist weder beim Farbstoff DY-505 noch beim Farbstoff DY-782 eine Änderung der Fluoreszenz festzustellen.

Zusätzlich wurden die Überstände vor und nach dem Waschen der Zellen vermessen. Während vor dem Waschen noch deutlich beide Signale zu finden sind, kann man in den Überständen nach dem Waschen keine Signale mehr nachweisen.

Die semiquantitative Auswertung der ermittelten Werte für das FRET-Paar DY-682/DY-782 (Abbildung 31) zeigt, dass zwischen den gemessenen Signalen allein und im Paar bei beiden Fluoreszenzfarbstoffen ein deutlicher Unterschied besteht. Das DY-682-Signal nimmt bei Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 ab. Auch die eingetragenen Standardfehler weisen diesen Signalabfall nach und zeigen einen deutlichen Unterschied in den Signalintensitäten. Die Mittelwerte des DY-682-Signals sinken dabei von 0,31 a.u. auf 0,02 a.u.. Damit nimmt das Signal um den Faktor 13 ab. Der mittels T-Testes ermittelte p-Wert beträgt 0,02. Die Änderung der Signalintensität ist somit signifikant.

Beim DY-782-Signal des FRET-Paares zeigt sich ein Anstieg der Signalintensität. Auch hier unterstreichen die eingetragenen Standardfehler die deutliche Änderung der Signalintensität.

## ERGEBNISSE

Der aus den Einzelmessungen errechnete Mittelwert des 782-Signals steigt von 0,006 a.u. auf 0,035 a.u. und damit um den Faktor 6 an. Der p-Wert beträgt hier 0,03 und zeigt somit auch hier eine Signifikanz an.

Die Diagramme für das Kontroll-Paar DY-505/DY-782 (Abbildung 32) zeigen hingegen kaum eine Veränderung der Signalintensitäten. Sowohl Donor- als auch Akzeptor-Signal bleiben nahezu konstant. Das DY-505-Signal steigt geringfügig von 0,025 a.u. auf 0,031 a.u.. Die eingetragenen Standardfehler überschneiden sich. Der mittels T-Testes errechnete p-Wert beträgt hier 0,50. Das DY-782-Signal des Kontroll-Paares bleibt konstant bei 0,0036 a.u.. Auch hier überschneiden sich die Standardfehler. Der ermittelte p-Wert beträgt 0,99. Es zeigen sich somit keine Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten.

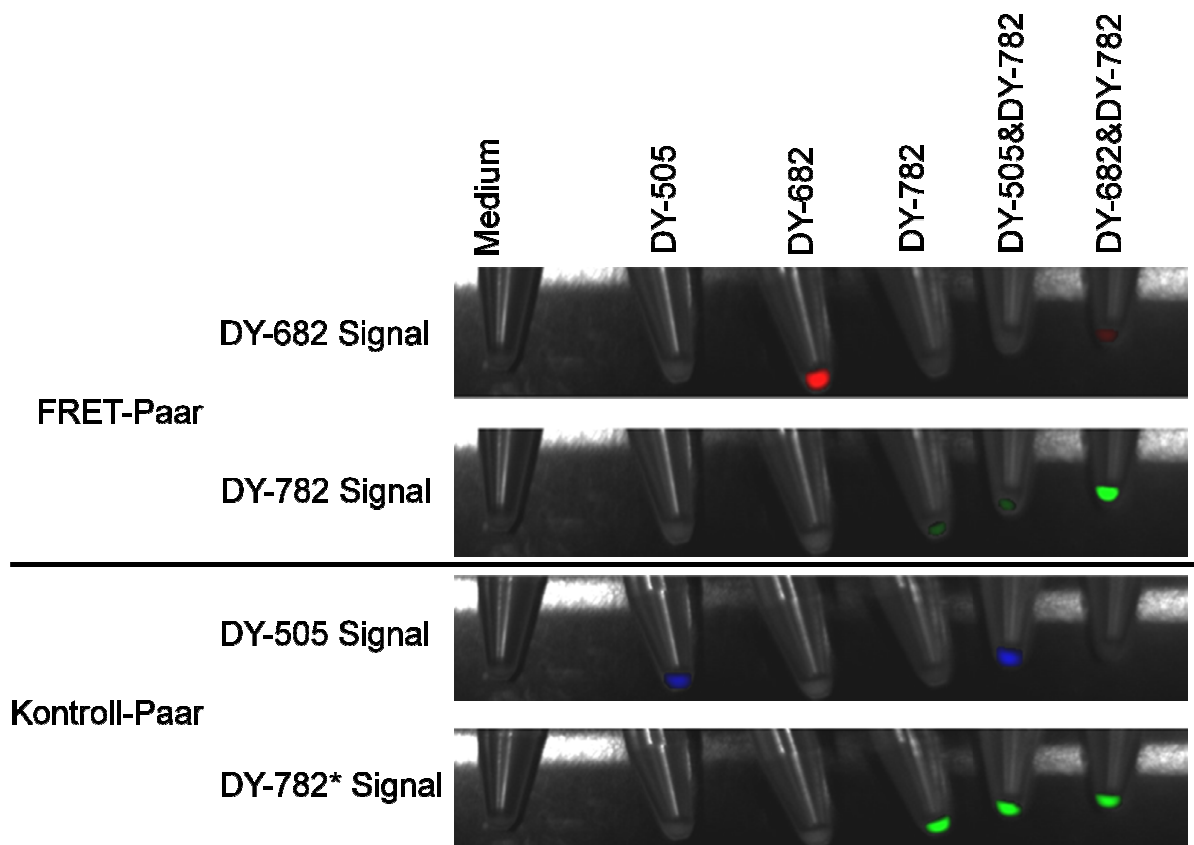


Abbildung 30: Darstellung der mit freiem Farbstoff inkubierten Makrophagen. Die Zellen wurden dabei mit einer Konzentration von 15  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  je Fluoreszenzfarbstoff für 24 h inkubiert. Dargestellt ist hier eine repräsentative Versuchsreihe. Die mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers gewonnenen Fluoreszenzbilder wurden über das Weiß-Bild der Cups gelegt. Für die Darstellung des FRET-Paares wurde die RED-Filter-Kombination (Ex: 615-665 nm; Em: 700 nm longpass) verwendet. DY-682 dient als Donor und DY-782 als Akzeptor. Für die Darstellung des Kontroll-Paares wurde die BLUE-RED-Filter-Kombination (Ex: 445-490 nm; Em-D: 515 nm longpass; Em-A: 700 nm longpass) verwendet. Hier dient DY-505 als Donor und DY-782 als Akzeptor. (Ex = Excitationsfilter; Em = Emissionsfilter; D = Donor; A = Akzeptor)

## FRET-Paar

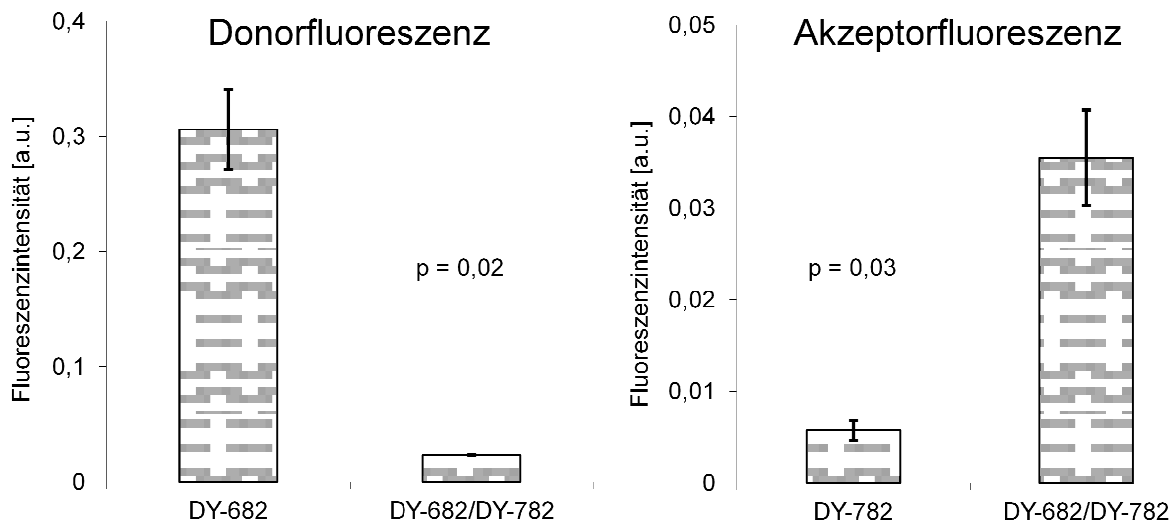


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Signalintensität der freien Fluoreszenzfarbstoffe des FRET-Paares. Es handelt sich um eine semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität (AUC) in 3 verschiedenen Versuchsreihen. Die mittlere ROI-Größe betrug 350 Pixel bei etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Aus den ermittelten Werten wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler bestimmt und beide in die Diagramme eingetragen. Als Donor fungiert der Farbstoff DY-682 und als Akzeptor der Farbstoff DY-782. In einem Diagramm wurde jeweils die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes allein und im Paar gegenübergestellt.

## Kontroll-Paar

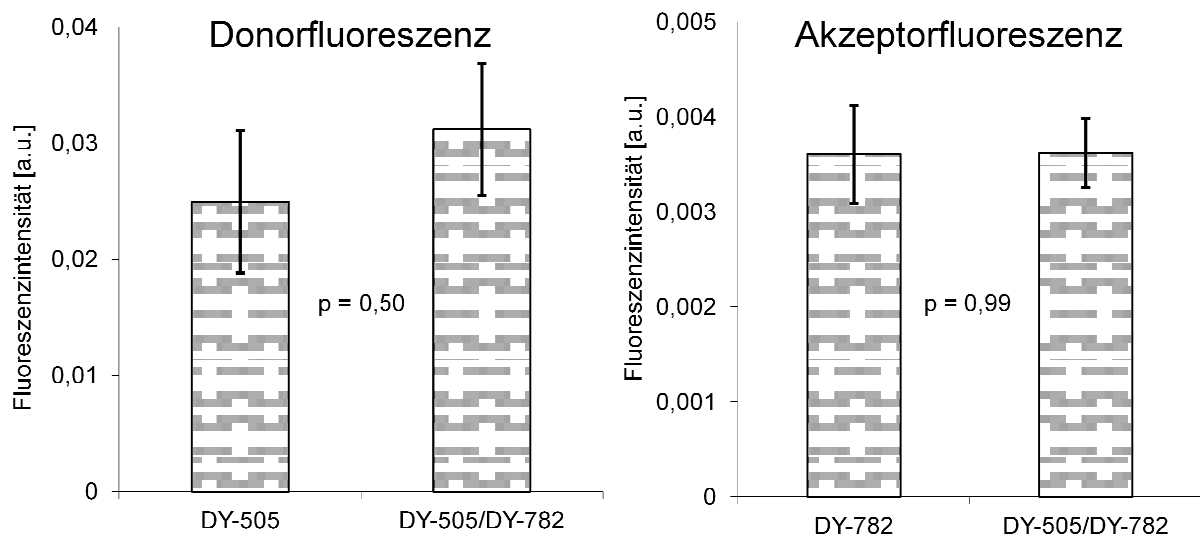


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Signalintensität der freien Fluoreszenzfarbstoffe des Kontroll-Paares. Es handelt sich um eine semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität (AUC) in 3 verschiedenen Versuchsreihen. Die mittlere ROI-Größe betrug 350 Pixel bei etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Aus den ermittelten Werten wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler bestimmt und beide in die Diagramme eingetragen. Als Donor fungiert der Farbstoff DY-505 und als Akzeptor der Farbstoff DY-782. In einem Diagramm wurde jeweils die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes allein und im Paar gegenübergestellt.

## ERGEBNISSE

### 4.2.1.2. Für den IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff

Die wie in 2.4.4.1. *Internalisierungsversuche mit Zellkulturflaschen* gewonnenen Cups wurden mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. In der nachfolgend gezeigten Abbildung 33 sind die gewonnenen Bilder einer repräsentativen Versuchsreihe jeweils für das FRET- und das Kontroll-Paar dargestellt.

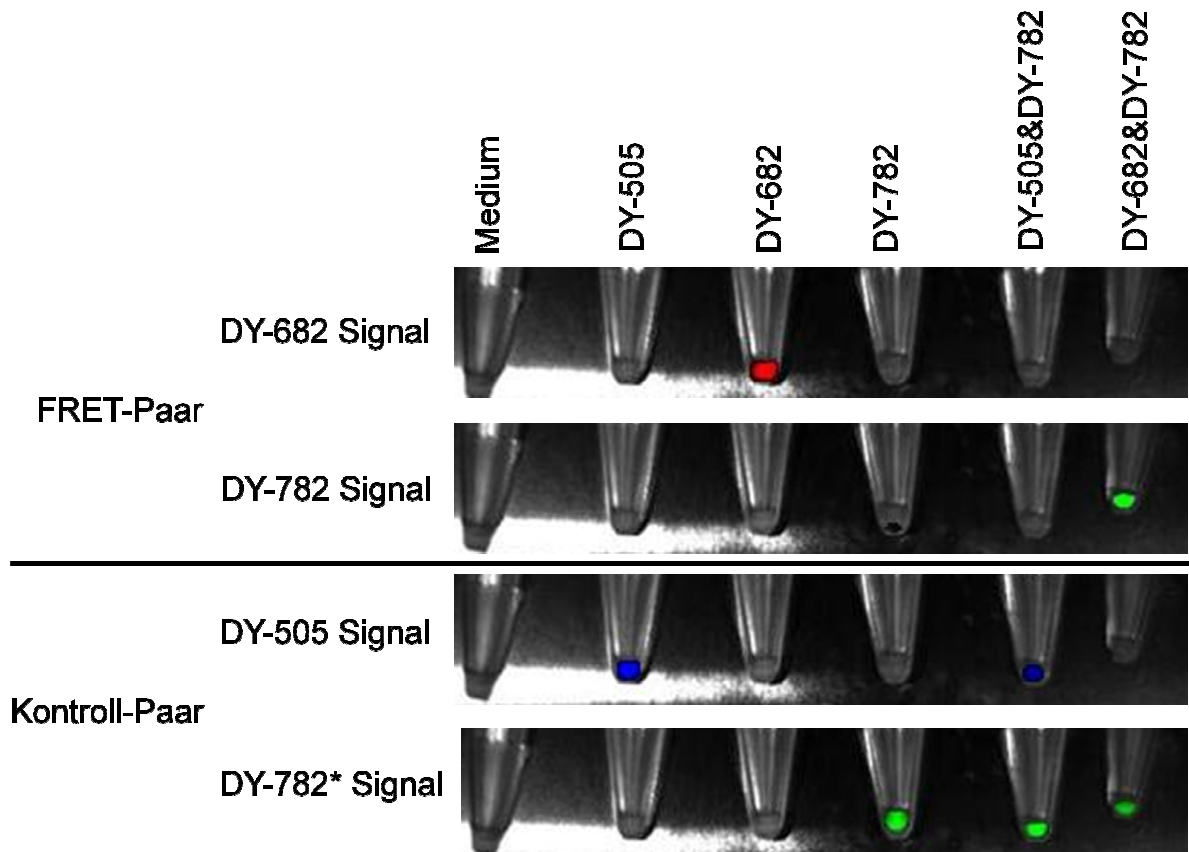


Abbildung 33: Darstellung der mit IgG-gekoppeltem Farbstoff inkubierten Makrophagen. Die Zellen wurden dabei mit einer Konzentration von 1,2  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  je Fluoreszenzfarbstoff für 24 h inkubiert. Dargestellt ist hier eine repräsentative Versuchsreihe. Die mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers gewonnenen Fluoreszenzbilder wurden über das Weiß-Bild der Cups gelegt. Für die Darstellung des FRET-Paares wurde die RED-Filter-Kombination (Ex: 616-665 nm; Em: 700 nm longpass) verwendet. DY-682 dient als Donor und DY-782 als Akzeptor. Für die Darstellung des Kontroll-Paares wurde die BLUE-RED-Filter-Kombination (Ex: 445-490 nm; Em-D: 515 nm longpass; Em-A: 700 nm longpass) verwendet. Hier dient DY-505 als Donor und DY-782 als Akzeptor. (Ex = Excitationsfilter; Em = Emissionsfilter; D = Donor; A = Akzeptor)

## FRET-Paar

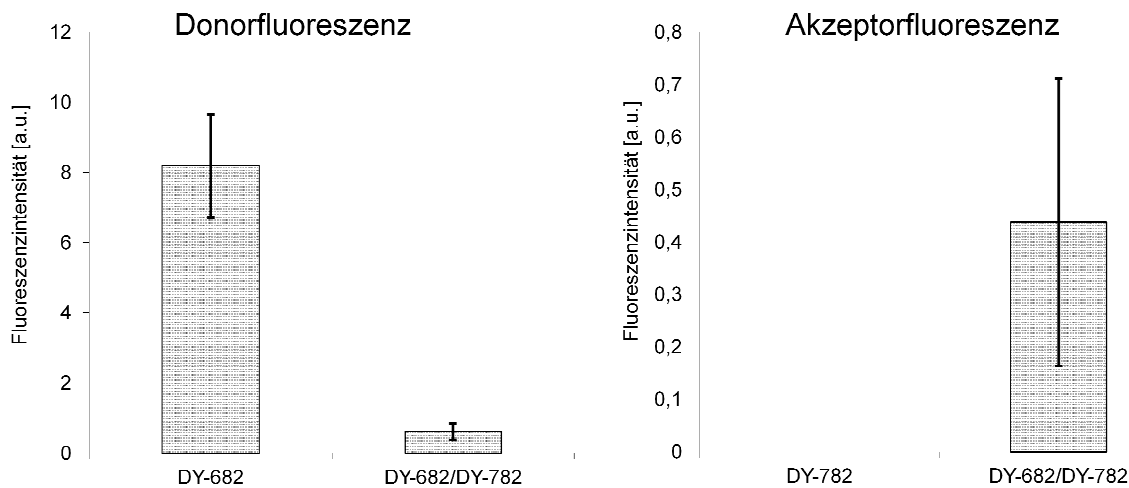


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Signalintensität der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe des FRET-Paares. Es handelt sich hierbei um eine semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität (AUC) in 3 verschiedenen Versuchsreihen. Die mittlere ROI-Größe betrug 350 Pixel bei etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Aus den ermittelten Werten wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler bestimmt und beide in die Diagramme eingetragen. Als Donor fungiert der Farbstoff DY-682 und als Akzeptor der Farbstoff DY-782. In einem Diagramm wurde jeweils die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes allein und im Paar gegenübergestellt.

## Kontroll-Paar

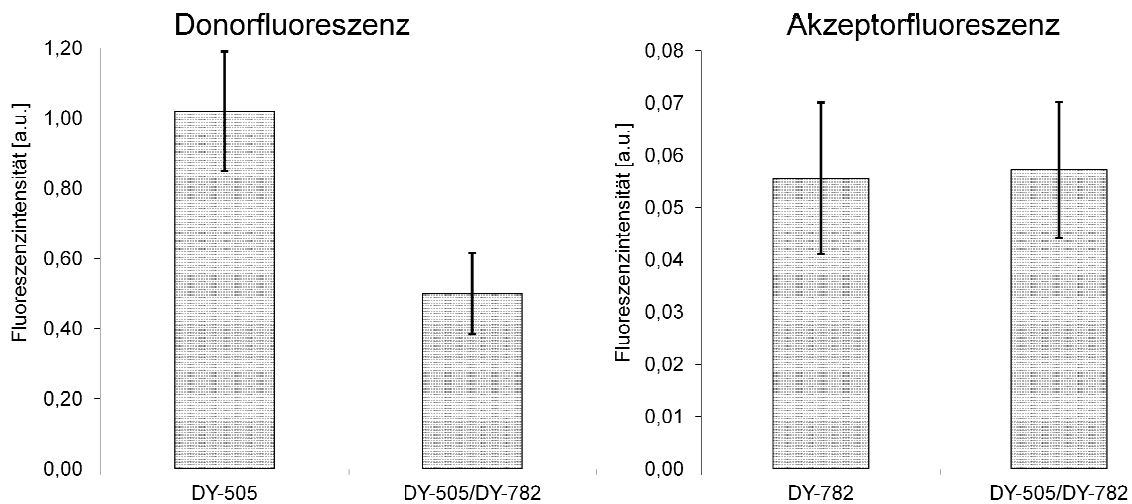


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Signalintensität der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe des Kontroll-Paares. Es handelt sich hierbei um eine semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität (AUC) in 3 verschiedenen Versuchsreihen. Die mittlere ROI-Größe betrug 350 Pixel bei etwa 80 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Aus den ermittelten Werten wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler bestimmt und beide in die Diagramme eingetragen. Als Donor fungiert der Farbstoff DY-505 und als Akzeptor der Farbstoff DY-782. In einem Diagramm wurde jeweils die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes allein und im Paar gegenübergestellt.

Beim IgG-gekoppelten Farbstoff zeigt sich in Abbildung 33 ebenfalls bereits optisch, dass das DY-682-Signal im Paar deutlich weniger fluoresziert als allein. Im Paar-Spot ist optisch keine Fluoreszenz mehr wahrnehmbar. Beim DY-782-Signal des FRET-Paares ist gut zu erkennen, dass im Paar eine wesentlich stärkere Fluoreszenz zu finden ist als allein. Hier ist im Einzel-Spot DY-782 keine Fluoreszenz wahrnehmbar.

Die Diagramme des FRET-Paares DY-682/DY-782 (Abbildung 34) unterstreichen den bereits optisch festgestellten Unterschied der Signalintensitäten. Während das DY-682-Signal deutlich abnimmt von 8,2 a.u. auf 0,6 a.u. und sich somit um den Faktor 13 verringert, steigt das 782-Signal von 0 a.u. auf 0,4 a.u.. Die eingetragenen Standardfehler zeigen, dass die Unterschiede zwischen den Signalintensitäten deutlich sind.

Beim Kontroll-Paar DY-505/DY-782 zeigen die Diagramme (Abbildung 35), dass es keinen Unterschied zwischen den Signalintensitäten im Einzel- und FRET-Spot gibt. Das DY-505-Signal sinkt dabei von 1,02 a.u. auf 0,5 a.u.. Das DY-782-Signal des Kontroll-Paares ändert sich kaum (von 0,056 a.u. auf 0,057 a.u.). Die eingetragenen Standardfehler überschneiden sich im Fall des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 und unterstreichen damit die Konstanz der Signalintensitäten. Es kommt also nicht zu einem Anstieg der Akzeptorfluoreszenz wie sie im Rahmen von FRET auftreten würde.

Auch hier waren in den Überständen vor dem Waschen noch starke Signale nachweisbar. Nach dem Waschen konnten keine Signale mehr in den abgenommenen Überständen nachgewiesen werden.

## ERGEBNISSE

### 4.2.2. Nachweis der Internalisierung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 durch Makrophagen

Die auf Chamber-Slides gebetteten inkubierten Makrophagen wurden mittels CLSM in Kooperation mit der Arbeitsgemeinschaft Habenicht vermessen. Die dabei entstandenen Bilder sind in Abbildung 36 dargestellt.

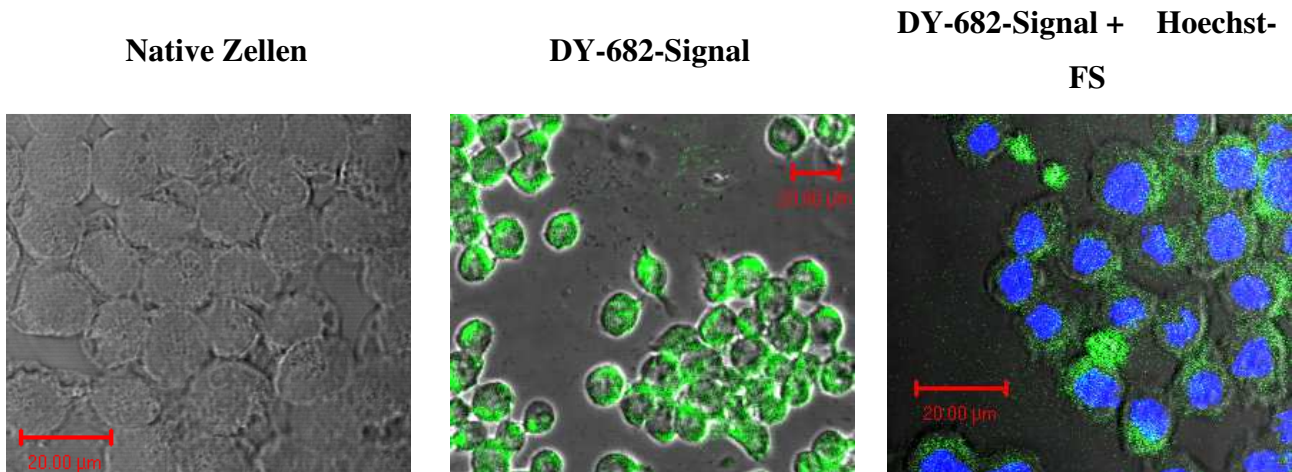


Abbildung 36: Darstellung der intrazellulären Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 in inkubierten Makrophagen. Links: Nativaufnahme der Makrophagen, Mitte: Darstellung des DY-682-Signal in den Makrophagen, Rechts: Darstellung des DY-682 und des Hoechst-Farbstoffes in den Makrophagen; Die Makrophagen wurden für 24 h mit einer Konzentration von 0,0012 nmol/µl Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert und mit 0,5 µg/ml Hoechst-Farbstoff gegengefärbt. Die Vermessung erfolgte mittels CLSM. Zur Anregung von DY-682 wurde ein Laser mit 633 nm Wellenlänge verwendet. Detektiert wurde mit einem 650 nm longpass Filter. Für den Hoechst-Farbstoff wurde zur Anregung ein Laser mit 365 nm und zur Detektion ein 450 nm longpass Filter genutzt.

Die Bilder zeigen das DY-682-Signal im Bereich der Zellen. Es war gut nachweisbar und zeichnet sich deutlich ab. Es ahmt die Umrisse der Zellen nach und spart dabei die Bereiche der Zellkerne aus.

Das DY-782-Signal konnte nicht aufgenommen werden, da das CLSM nur Spektren bis zu einer Wellenlänge des Lichtes von 750 nm aufnehmen kann. Dies stellt die aktuelle technische Grenze des CLSM-Verfahrens dar. Das DY-782-Signal liegt damit außerhalb des registrierbaren Bereiches des CLSM. Es konnten deshalb keine weiteren Bearbeitungen der Spektren und damit auch kein Nachweis von FRET durchgeführt werden.



### 4.3. Tierversuche mit lokaler Applikation Farbstoff inkubierter Makrophagen

Die aus der Vermessung der wie in 2.4.4.1. *Untersuchung von Fluoreszenz und FRET nach s.c. Applikation von inkubierten Zellen* behandelten Zellen gewonnenen Bilder sind in Abbildung 37 dargestellt. Diese hier dargestellten Bildern entstanden durch Überlagerung der Weiß-Bilder mit den Fluoreszenzbildern. In den Fluoreszenzbildern wurden hier die Signalintensitäten mit Falschfarben dargestellt. Dabei steht Rot für eine hohe und Blau für eine geringe Signalintensität. Es lässt sich damit deutlicher die Änderung der Signalintensitäten zwischen Einzel-Spot und Paar-Spot zeigen. Die gefundenen Signale der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden stets in den zugehörigen Arealen nachgewiesen. Der Farbstoff DY-505 konnte nicht dargestellt werden.

Beim FRET-Paar zeigt sich eine Verringerung der Signalstärke des DY-682-Signals vom Einzel-Spot zum Paar-Spot. Das DY-782-Signal nimmt hingegen vom Einzel-Spot zum Paar-Spot hin zu.

Beim Kontroll-Paar zeigt sich ein solches Verhalten der Signalintensitäten nicht. Das DY-505-Signal konnte nicht registriert werden. Das DY-782-Signal konnte hingegen registriert werden. Bereits in den Bildern zeigt sich jedoch, dass hier keine Veränderung der Signalintensität zu finden ist.

Die nach Vermessung der Spots zu den Zeiten 0 h, ½ h, 1 h, 2 h und 24h ermittelten Werte wurden in die Diagramme der Abbildung 38 eingetragen. In diesen Diagrammen ist ein deutlicher Trend der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten zu finden.

Bei der grafischen Darstellung des FRET-Paares zeigt der Donor (DY-682) eine anhaltende Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit. Des Weiteren ist festzustellen, dass die Signalintensität im Einzel-Spot stets höher ist als im Paar-Spot. Die eingetragenen Standardfehler unterstreichen diesen Trend.

Das vermessene Akzeptorsignal (DY-782) des FRET-Paares steigt zunächst von 0 h bis ½ h an. Danach fällt es konsequent ab. Beim Vergleich von Einzel-Spot und Paar-Spot fällt auf, dass die Signalintensität in Anwesenheit des Donors stets höher ist als ohne Donor. Die eingezeichneten Standardfehler unterstreichen diesen Trend.

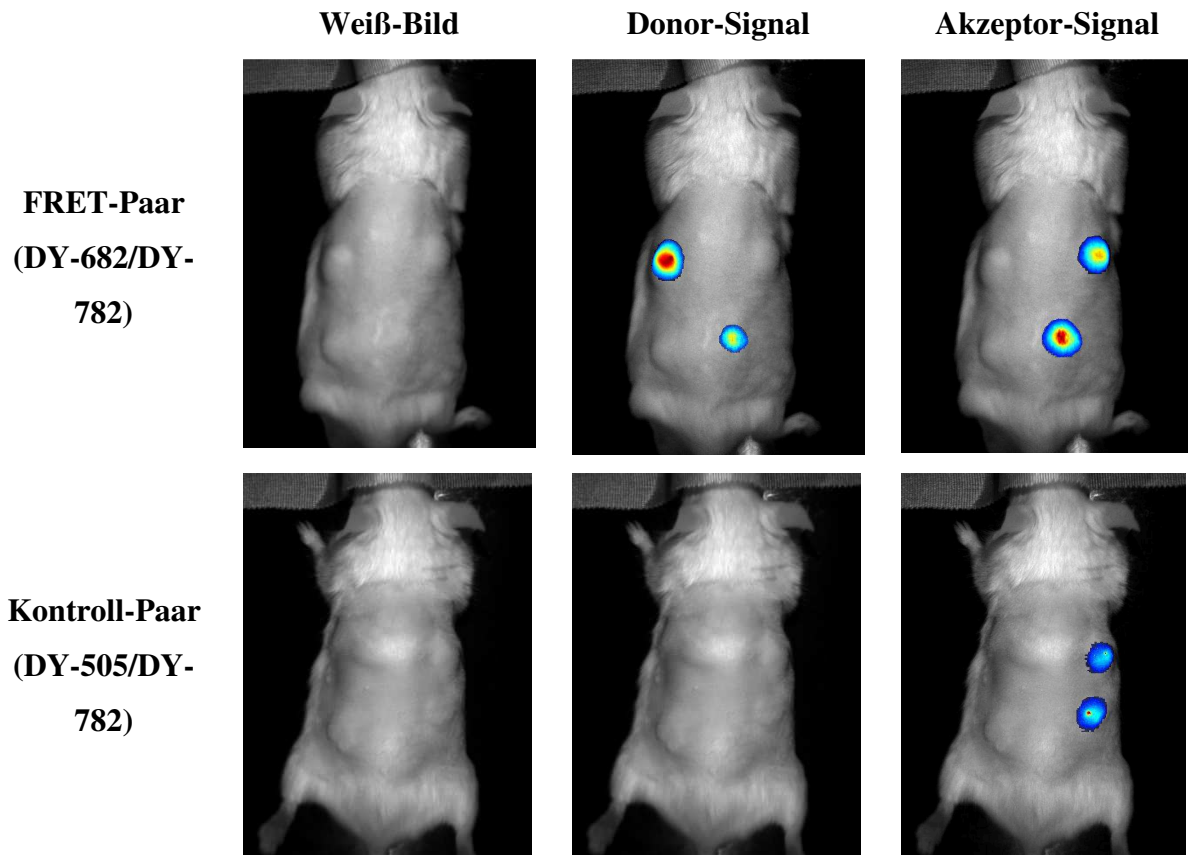


Abbildung 37: Fluoreszenz der Mäuse nach subcutan-Applikation von mit Fluoreszenzfarbstoff behandelten Makrophagen. Abgebildet ist jeweils eine repräsentative Maus aus der FRET-Paar und eine aus der Kontroll-Paar Gruppe bei der Messung zum Zeitpunkt 30 min. Die Signalstärke wird hier mittels Falschfarben dargestellt, wobei Rot eine hohe und Blau eine geringe Signalintensität darstellt. Von links nach rechts sind jeweils Weiß-Bild, Donor-Signal und Akzeptor-Signal dargestellt. Die Makrophagen waren vorher für 24 h mit einer Konzentration von 2 nmol/ml des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes inkubiert worden. Zur Darstellung mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager wurde für die FRET-Paar-Gruppe die RED-Filter-Kombination (Ex: 616-665 nm; Em: 700 nm longpass) und für die Kontroll-Paar-Gruppe zur Darstellung des Donor-Signals die BLUE-Filter-Kombination (Ex: 445-490 nm; Em: 515 nm longpass) und zur Darstellung des Akzeptor-Signals die BLUE-RED-Filter-Kombination (Ex: 445-490 nm; Em: 700 nm longpass) verwendet. (Ex = Excitationsfilter; Em = Emissionsfilter)

Die Diagramme des Kontroll-Paares sind ebenfalls in Abbildung 38 dargestellt. Da für den Donor (Farbstoff DY-505) nur unspezifisches Rauschen aufgezeichnet wurde, sind die ermittelten Werte aus den Spots nicht zu verwerten und stellen Artefakte dar, welche durch die unterschiedliche Intensität dieses Rauschens entstanden sind.

Das Akzeptorsignal (Farbstoff DY-782) des Kontroll-Paares fällt über die Zeit hin ab. Zwischen Einzel-Spot und Paar-Spot ist kaum ein Unterschied festzustellen. Die eingetragenen Standardfehler überschneiden sich stets.

## ERGEBNISSE

Weiterhin wurde das Akzeptorintensitätsverhältnis der Signalintensität im Paar geteilt durch die Signalintensität allein jeweils für das FRET- und das Kontroll-Paar über alle Messzeiten bestimmt. Die in Abbildung 39 eingetragenen Mittelwerte dieser Verhältnisse zeigen, dass das Akzeptorsignal des FRET-Paares im Vergleich zur Signalintensität allein deutlich um den Faktor 3,9 ansteigt, während das Akzeptorsignal des Kontroll-Paares mit einem Faktor von 1,0 konstant bleibt. Der mittels zweiseitigen T-Tests für zwei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz ermittelte p-Wert für diese Werte liegt bei kleiner 0,01 und zeigt somit eine deutliche Signifikanz an.

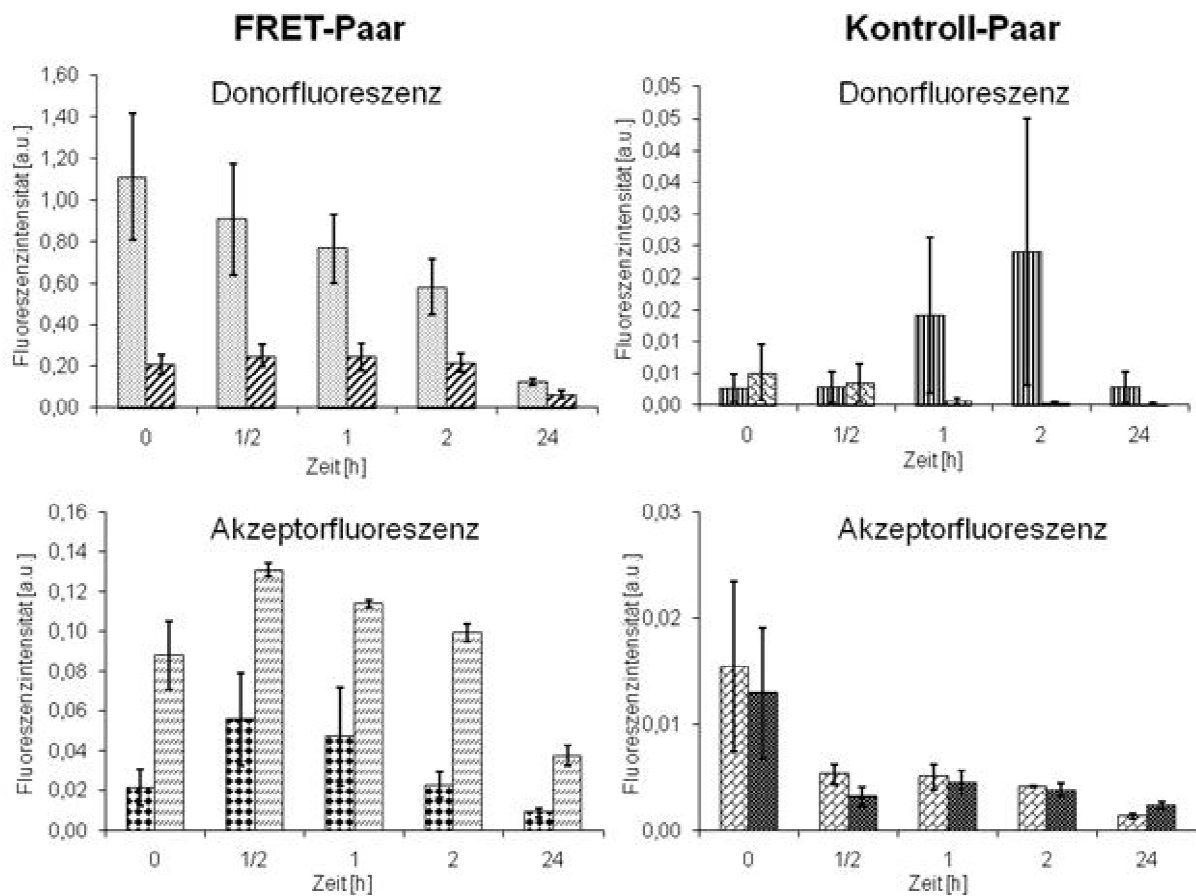


Abbildung 38: Semiquantitative Auswertung des Signalintensitätsverlaufes der Fluoreszenzsignale nach subcutaner Applikation der mit Fluoreszenzfarbstoff behandelten Makrophagen. Dargestellt ist der Signalintensitätsverlauf sowohl für die FRET-Paar-Gruppe als für die Kontroll-Paar-Gruppe über die Zeit. Das obere Diagramm zeigt dabei das Donorsignal und das untere das Akzeptorsignal. Es wurden jeweils die Signale Allein (linker Balken) den jeweiligen Signalen im Paar (rechter Balken) gegenübergestellt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität aus 3 Versuchsreihen sowie die Standardfehler der Messungen. Die mittlere ROI-Größe bei der Vermessung der Spots betrug 2500 Pixel bei etwa 40 Pixeln pro mm<sup>2</sup>.

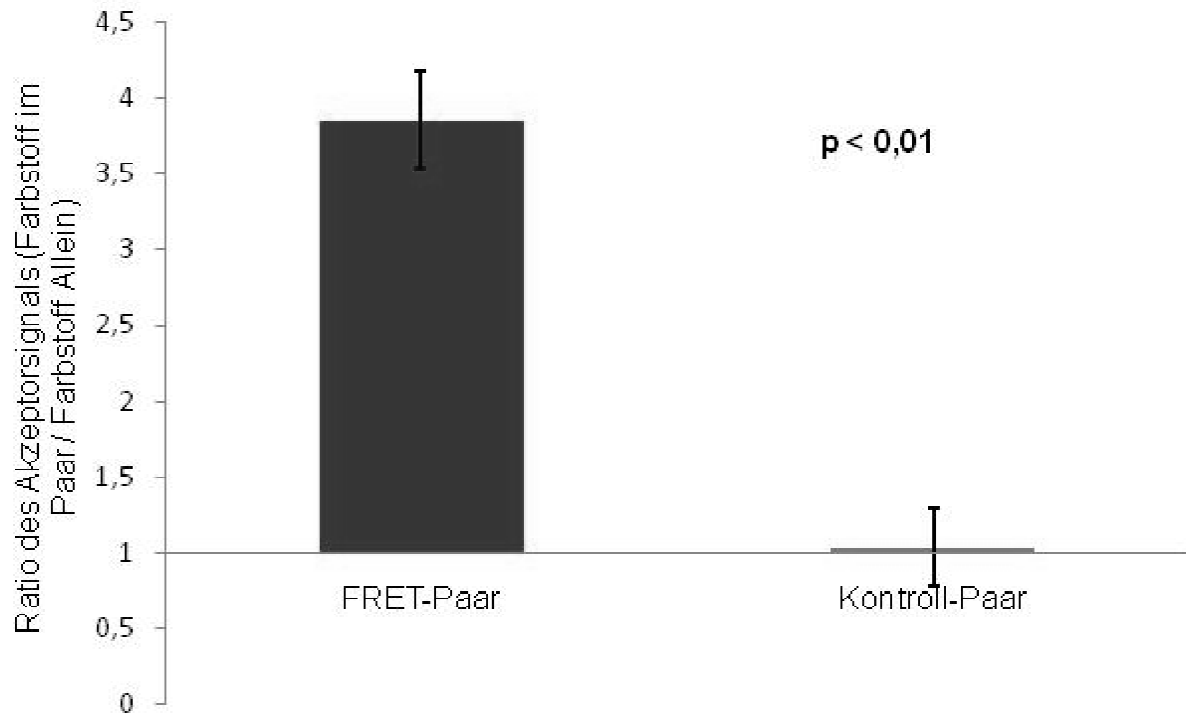


Abbildung 39: Ratio des Akzeptorverhaltens für das FRET-Paar und das Kontroll-Paar. Ermittelt wurde zunächst das Verhältnis aus Akzeptorsignalintensität im Paar / Akzeptorsignalintensität Allein zu jedem gemessenen Zeitpunkt jeweils für das FRET- und das Kontroll-Paar. Danach wurden aus diesen Werten die Mittelwerte und die Standardfehler bestimmt und in das Diagramm eingetragen. Ebenfalls wurde der errechnete p-Wert für das Verhältnis von FRET- und Kontroll-Paar zueinander angegeben. Die mittlere ROI-Größe für die Vermessung der Spots betrug 2500 Pixel bei etwa 40 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Die X-Achse wurde dabei auf Y = 1 verschoben. Ein Wert von Y = 1 stellt keine Änderung der Signalintensitäten dar. Oberhalb der X-Achse kommt es zu einem Anstieg und unterhalb der X-Achse zu einem Abfall der Signalintensität im Paar im Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff Allein.

Um den Nachweis zu erbringen, dass der Farbstoff DY-505 tatsächlich in den injizierten Makrophagen enthalten war, wurden die implantierten Zellpellets bei einer repräsentativen Maus der Kontroll-Paar-Gruppe nach dem Abtöten heraus präpariert. Das Fluoreszenzbild der in Cups gefüllten gewonnenen Zellpellets ist in Abbildung 40 zu sehen. Es ist deutlich zu sehen, dass hier das DY-505-Signal gut zu isolieren ist.

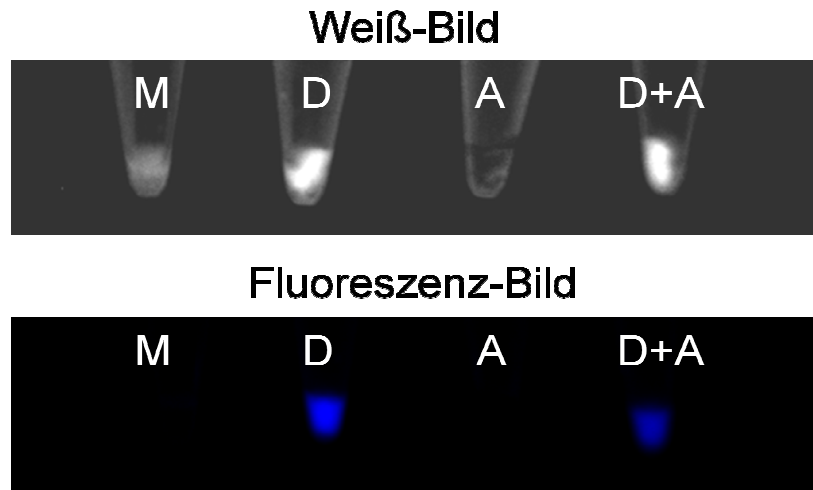


Abbildung 40: Darstellung der Fluoreszenz in post-mortem aus einer Kontroll-Paar-Maus heraus präparierten Zellpellets. Es wurden die Zellpellets einer repräsentativen Maus der Kontroll-Paar-Gruppe nach Abtöten heraus präpariert und mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers vermessen. Abgebildet ist zum einen das Weiß-Bild und zum anderen das Fluoreszenzbild mit der dem Farbstoff DY-505 zugewiesenen Falschfarbe Blau. Dabei sind v.l.n.r. die Zellpellets mit M = Medium; D = Donor; A = Akzeptor; D + A = Donor und Akzeptor plaziert wurden. Für diese Darstellung wurde die BLUE-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 445-490 nm; Emissionsfilter: 515 nm longpass) verwendet.

### 4.4. In vivo Nachweis von FRET nach systemischer Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe

Die Mäuse, welche nach Erzeugung eines Ödems die Fluoreszenzfarbstoffe intravenös erhalten haben (beschrieben unter 2.4.4.2. *Untersuchung von Fluoreszenz und FRET am Ödemmodell*), zeigten im Entzündungsgebiet deutliche Fluoreszenz.

In Abbildung 41 ist die FRET-Paar-Gruppe dargestellt. Hier kann man durch die Darstellung der Signalintensitäten mittels Falschfarben (Blau = geringe Intensität; Rot = hohe Intensität) das Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe allein und im Paar gut beurteilen. Es ist bereits optisch zu erkennen, dass das Donorsignal abnimmt und das Akzeptorsignal zunimmt.

Die Bilder der Kontroll-Paar-Gruppe, dargestellt in Abbildung 42, zeigen nur ein geringes Donorsignal allein und kein registrierbares Signal im Paar. Das Akzeptorsignal kann überhaupt nicht nachgewiesen werden.

Die mitgeführten Kontrollen (einmal Nativ und einmal reine Zymosan Applikation) zeigten bei keiner der verwendeten Filtereinstellungen ein Signal im Entzündungsgebiet. Nach Abzug der Autofluoreszenz sind hier zu allen Zeiten stets Werte um 0 zu finden.

## FRET-Paar

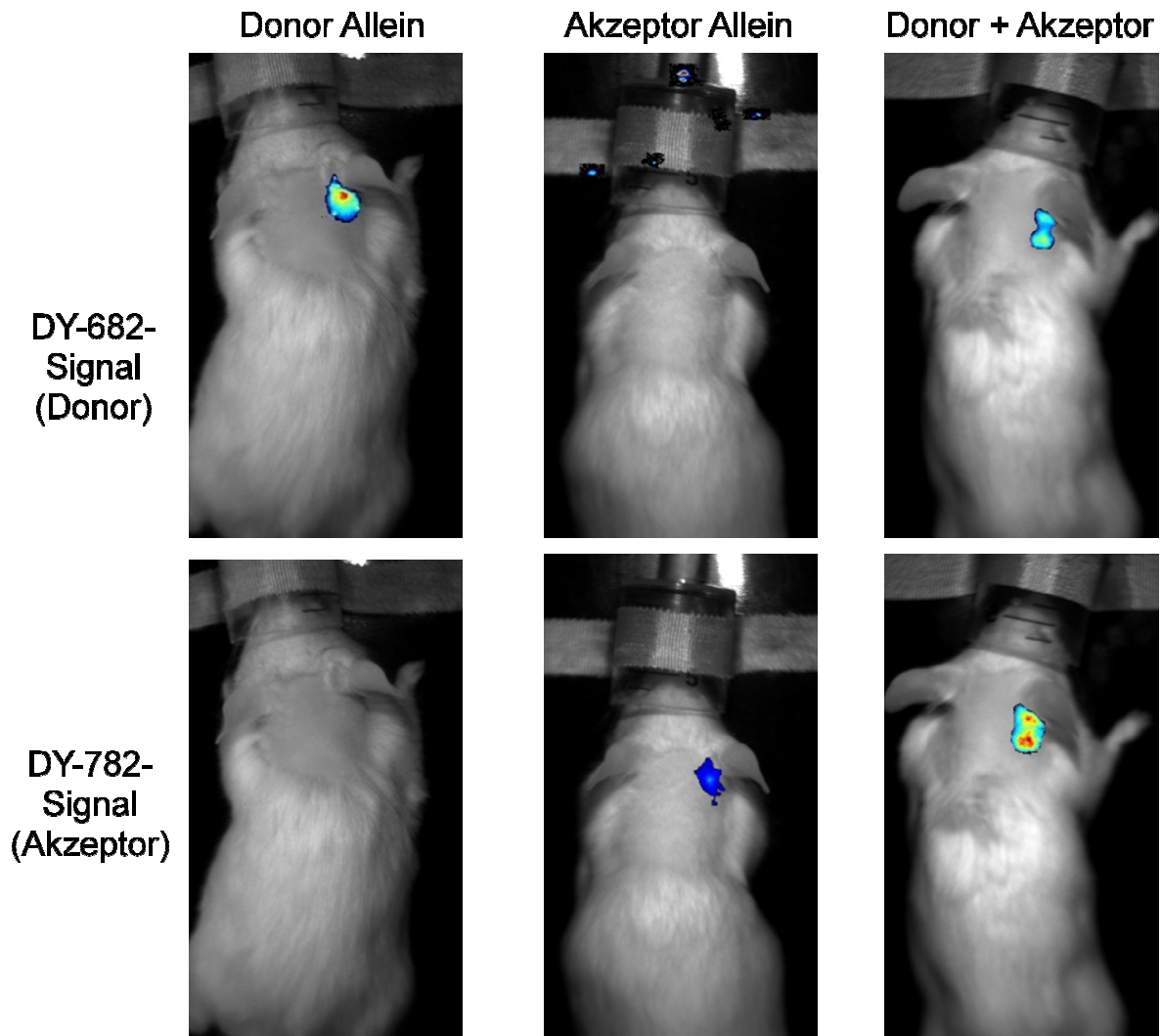


Abbildung 41: Darstellung der Fluoreszenzen in der FRET-Paar-Gruppe. Dargestellt sind die mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers detektierten Fluoreszenzen im Entzündungsgebiet nach intravenöser Gabe von 55 nmol/kg Körpergewicht der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Gabe der Fluoreszenzfarbstoffsonde erfolgte gleichzeitig mit der Applikation von Zymosan. Die Signalintensität wird hier mittels Falschfarben dargestellt, wobei Rot eine hohe und Blau eine geringe Signalintensität angibt. Die Fluoreszenzbilder wurden nachträglich über das jeweilige Weiß-Bild gelegt. Zur Anwendung kam zur Darstellung beider Fluoreszenzfarbstoffe die RED-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 615-665 nm; Emissionsfilter: 700 nm longpass). Abgebildet sind jeweils repräsentative Bilder, welche zum Zeitpunkt 4 h nach Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe aufgenommen wurden.

## Kontroll-Paar

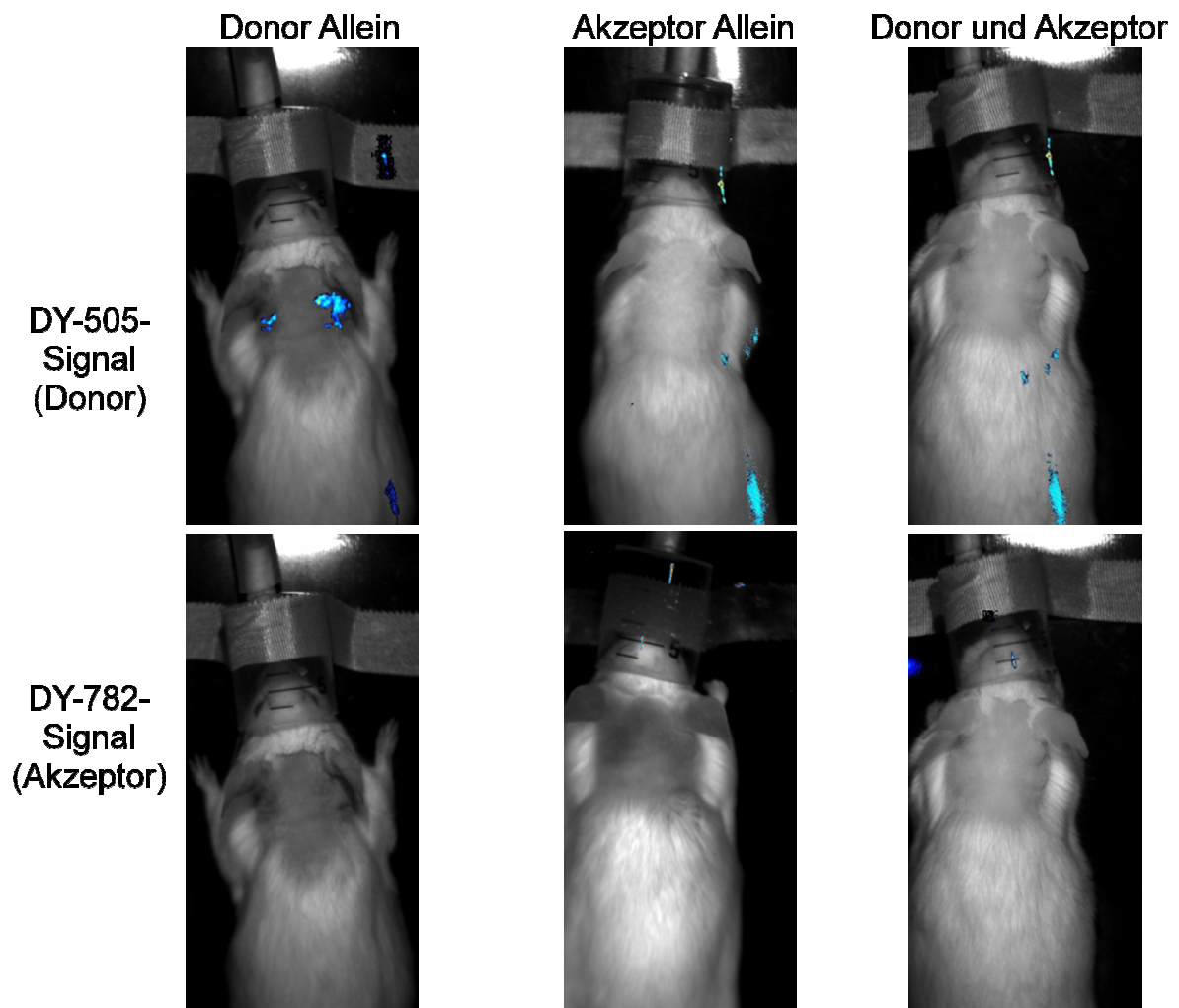


Abbildung 42: Darstellung der Fluoreszenzen in der Kontroll-Paar-Gruppe. Dargestellt sind die mittels des Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimagers detektierten Fluoreszenzen im Entzündungsgebiet nach intravenöser Gabe von 55 nmol/kg Körpergewicht der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Gabe der Fluoreszenzfarbstoffsonde erfolgte gleichzeitig mit der Applikation von Zymosan. Die Signalintensität wird hier mittels Falschfarben dargestellt, wobei Rot eine hohe und Blau eine geringe Signalintensität angibt. Die Fluoreszenzbilder wurden nachträglich über das jeweilige Weiß-Bild gelegt. Zur Anwendung kamen zur Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 die BLUE-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 445-490 nm; Emissionsfilter: 515 nm longpass) und zur Darstellung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 die BLUE-RED-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 445-490 nm; Emissionsfilter: 700 nm longpass). Abgebildet sind jeweils repräsentative Bilder, welche zum Zeitpunkt 4 h nach Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe aufgenommen wurden.



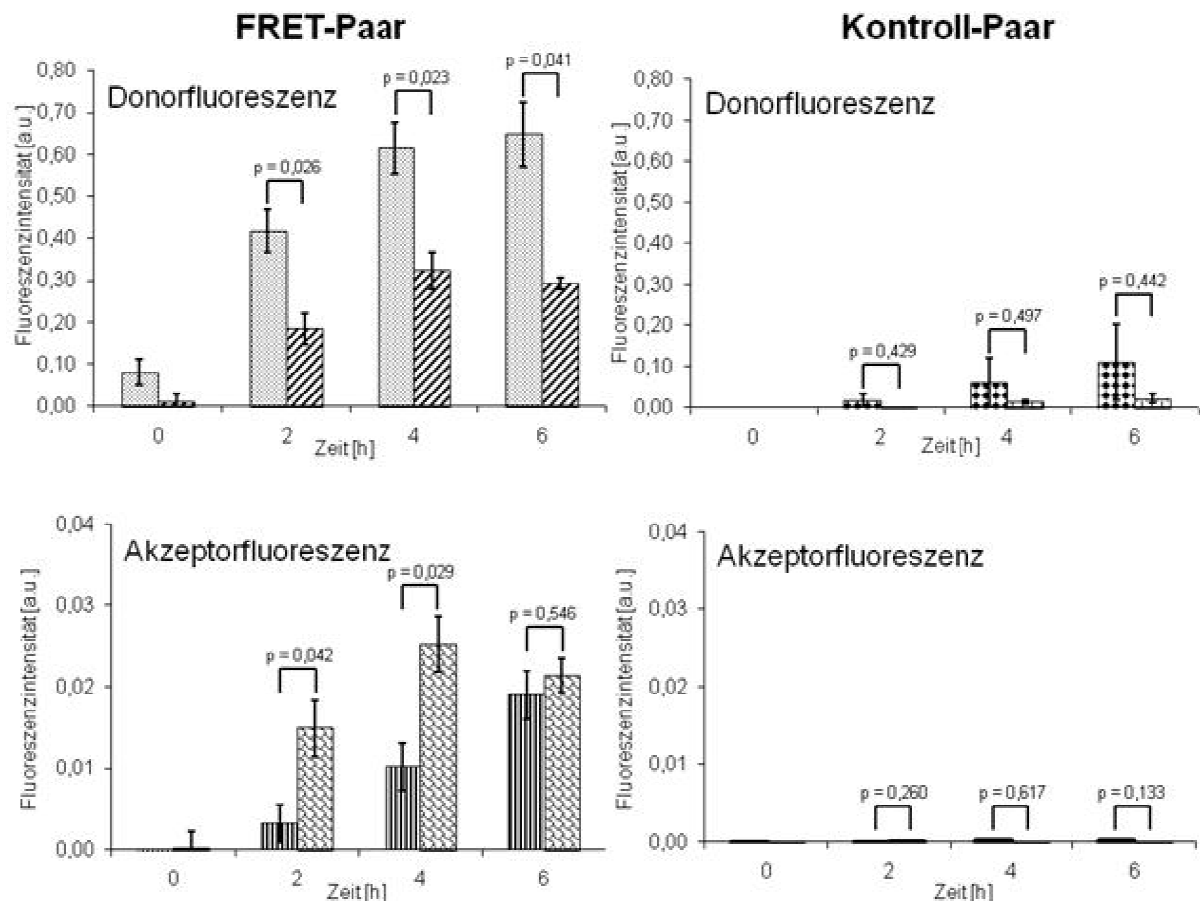


Abbildung 43: Semiquantitative Auswertung der Signalintensitäten für FRET- und Kontroll-Paar. Nach gleichzeitiger subcutaner Gabe von Zymosan und intravenöser Applikation von 55 nmol/kg Körpergewicht der entsprechenden IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Signalintensitäten im Ödem über 6 h gemessen und anschließend aufgetragen. Es wurde jeweils das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes Allein (links) mit dem des Fluoreszenzfarbstoffes im Paar (rechts) zusammen aufgetragen. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten stellen die Mittelwerte der aus 3 Versuchsreihen bestimmten AUC (Area under the curve = Fläche unter der Kurve) der Spektren des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes dar. Aufgetragen wurden zusätzlich die ermittelten Standardfehler der Messungen sowie die mit Hilfe eines zweiseitigen T-Testes für zwei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz bestimmten p Werte. Die mittlere ROI-Größe betrug 2000 Pixel bei etwa 40 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Zur Anwendung für die Darstellung der Fluoreszenzfarbstoffe kamen beim FRET-Paar die RED-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 615-665 nm; Emissionsfilter: 700 nm longpass) und beim Kontroll-Paar für den Donor die BLUE-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 445-490 nm; Emissionsfilter: 515 nm longpass) und für den Akzeptor die BLUE-RED-Filter-Kombination (Excitationsfilter: 445-490 nm; Emissionsfilter: 700 nm longpass).

Die

in

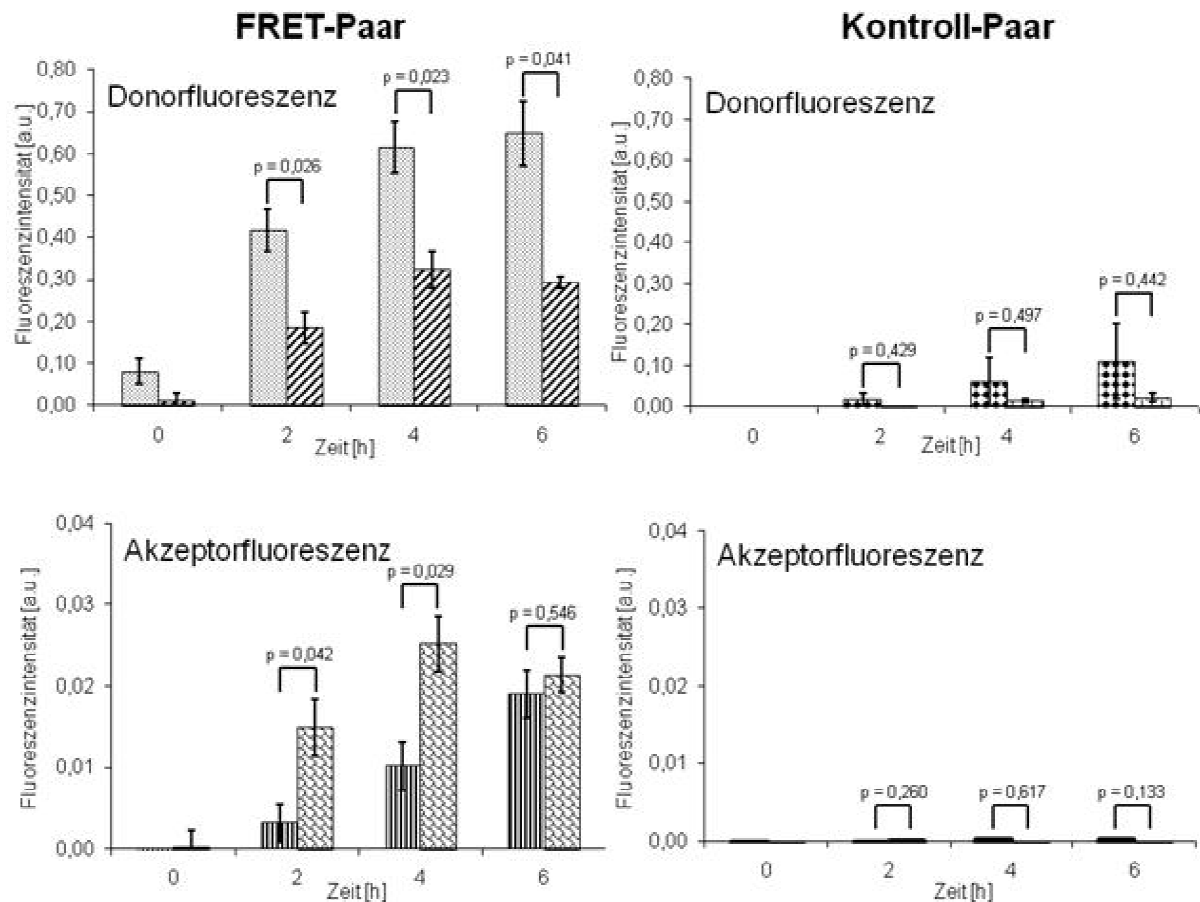


Abbildung 43 abgebildeten Diagramme, welche die Entwicklung der verschiedenen Signale über die Zeit darstellen, zeigen für das Donorsignal (Farbstoff DY-682) des FRET-Paares, dass das Farbstoff-Signal allein über alle Zeiten, das Signal im Paar jedoch nur bis zur Messung bei 4 h ansteigt. Der 6 h Wert fällt zum vorherigen Wert hin ab. Vergleicht man das Donorsignal allein mit dem im Paar, zeigt sich eine deutlich Abnahme der Signalintensität bei Anwesenheit des Akzeptors. Diese Abnahme zeigt sich zu allen Zeiten und ist signifikant auf einem Niveau von  $\alpha = 0,05$  (einzelne p-Werte siehe Diagramm).

Das Akzeptorsignal (Farbstoff DY-782) des FRET-Paares steigt allein ebenfalls über alle Zeiten an. Im Paar jedoch ist hier ein deutlicher Abfall der Signalintensität zur Zeit 6 h zu sehen. Vergleicht man das Akzeptorsignal allein mit dem Signal im Paar so ist zu sehen, dass es in den Zeiten 2 h und 4 h signifikant ansteigt (siehe p-Werte im Diagramm). Zum Zeitpunkt 6 h ist kein Anstieg mehr zu sehen und auch der p-Wert von 0,541 zeigt das keine Signifikanz mehr zu finden ist.

Beim Kontroll-Paar zeigt sich, dass das Donorsignal (Farbstoff DY-505) über alle Zeiten ansteigt sowohl allein als auch im Paar. Vergleicht man das Donorsignal allein mit dem im Paar gefundenen, erkennt man zunächst eine Abnahme der Signalintensität. Dabei

## ERGEBNISSE

überschneiden sich die eingetragenen Standardfehler von Signal allein und Signal im Paar jedoch zu allen Zeiten. Die ermittelten p-Werte (siehe Diagramm) zeigen das hierbei keine Signifikanz zu finden ist. Es kann somit nicht von einem tatsächlichen Abfall des Signals gesprochen werden.

Das Akzeptorsignal (Farbstoff DY-782) beim Kontroll-Paar zeigt keinen erkennbaren Verlauf über die Zeiten. Bereits optisch ist zu sehen, dass kein eigentliches Signal zu finden ist. Auch der Vergleich von Signal allein und Signal im Paar mittels T-Test zeigt keine Signifikanzen (p-Werte siehe Diagramm).

In Abbildung 44 sind die errechneten Signalintensitätsverhältnisse von Signal im Paar geteilt durch Signal allein dargestellt. Dabei ist für das FRET-Paar zu sehen, dass das DY-682-Signal im Paar zu jeder Messzeit etwa um den Faktor 0,5 zum DY-682-Signal allein abnimmt. Das DY-782-Signal nimmt dagegen nur zum Zeitpunkt 0 ab. Bei den Messungen nach 2 und 4 Stunden zeigt sich ein deutlicher Anstieg um den Faktor 2,25 bis 2,5. Zum Messzeitpunkt 6 h ist keine Änderung des 782-Signals feststellbar.

Für das Kontroll-Paar zeigt sich, dass alle gefundenen Signale abfallen, diese dabei oft auf 0%. Der Abfall des DY-782-Signals ist dabei deutlich stärker als der des DY-505-Signals.

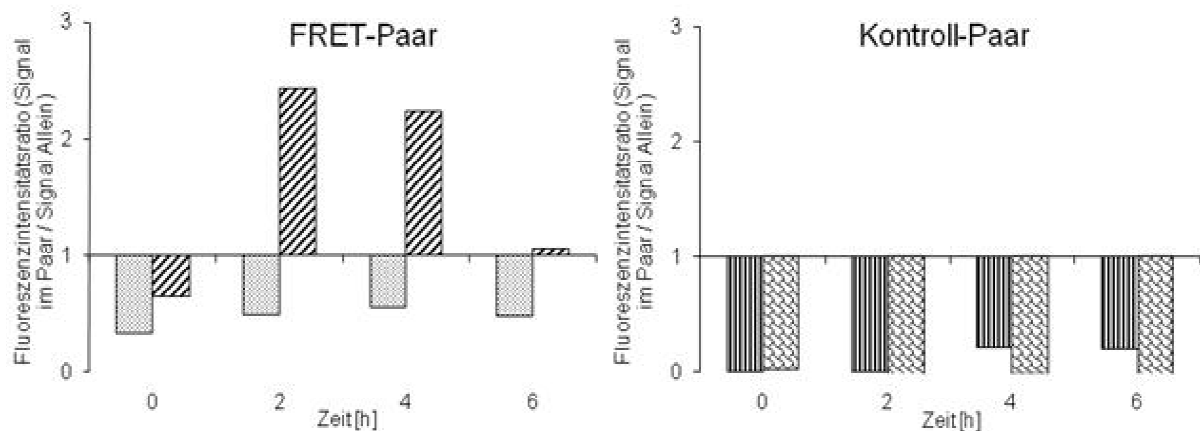


Abbildung 44: Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitätsratios (Signal im Paar / Signal Allein). Es wurde zu jedem Messzeitpunkt dieses Verhältnis errechnet und in den Diagrammen eingetragen. Die mittlere ROI-Größe betrug 2000 Pixel bei etwa 40 Pixeln pro mm<sup>2</sup>. Die X-Achse wurde dabei auf Y = 1 verschoben. Ein Wert von Y = 1 stellt keine Änderung der Signalintensitäten dar. Oberhalb der X-Achse kommt es zu einem Anstieg und unterhalb der X-Achse zu einem Abfall der Signalintensität im Paar im Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff Allein. (Im FRET-Paar: gepunktet = Donor (DY-682); diagonale Streifung = Akzeptor (DY-782); Im Kontroll-Paar: vertikale Streifung = Donor (DY-505); Dachziegelmuster = Akzeptor (DY-782))

### 4 Diskussion

Um die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge einer Entzündungsreaktion untersuchen und verstehen zu können, muss eine Methode geschaffen werden, die es ermöglicht die tatsächliche Interaktion von Enzymen und anderen Proteinen darzustellen. FRET ermöglicht eine solche Darstellung von Interaktionen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das hier erarbeitete System aus verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffpaaren geeignet ist, FRET nicht nur auf Nitrozellulosemembranen, sondern auch in vitro und in vivo nachzuweisen. Die in vivo Darstellung von FRET sowohl in applizierten Zellpellets, und damit durch die Haut der Tiere hindurch, als auch in einem entzündlichen Prozess am Ohrödemmodell war erfolgreich. Des Weiteren wurde die Internalisierung des Fluoreszenzfarbstoffes durch Makrophagen mittels CLSM gezeigt. Das in dieser Arbeit erarbeitete System kann somit eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen in Entzündungsprozessen sein. Der in dieser Arbeit als Marker verwendete Anstieg des Akzeptorsignals zum Nachweis von FRET und damit der räumlichen Nähe zweier Fluoreszenzfarbstoffe kann als Grundlage für weiterführende Modifikationen dieser Untersuchungsmethode dienen. Die in bisherigen Arbeiten genutzten FRET-Darstellungen mit nur einem Target, wie bei Matthew J. Hangauer und Carolyn R. Bertozzi, welche das Prinzip des FRET nutzen um den Akzeptor als Quencher zu verwenden und nach Abspaltung von diesem ein Signal zu erhalten (Hangauer und Bertozzi 2008), reichen nicht aus, um die komplexen Prozesse einer Entzündung zu erfassen. Mit dem hier entwickelten System kann die Interaktion von zwei Targets sichtbar gemacht werden. Auch bietet das System das Potential zum Einsatz im Bereich der Entzündungsdiagnostik.

Zum Nachweis dieser Eigenschaften wurden verschiedene experimentelle Stadien durchlaufen. Das gewählte FRET-System wurde zunächst auf einer Nitrozellulosemembran untersucht. In dieser Umgebung mit zunächst einem Minimum an möglichen Störfaktoren gelang der Nachweis von FRET. Der verzeichnete Abfall des Donor-Signals von der Situation des Fluoreszenzfarbstoffes Allein zu einer mit Anwesenheit des Akzeptors beim FRET-Paar ist hierbei darauf zurückzuführen, dass der Donor die durch das Excitationslicht aufgenommene Energie bei Kombination mit dem zweiten Farbstoff auf eine andere Art als durch Photonen abgibt. Er gibt die Energie offenbar an den Akzeptor ab, wodurch es zu dem beobachteten Anstieg der Akzeptorfluoreszenz im Vergleich Farbstoff allein zu Farbstoff im Paar kommt. Bei der Kontroll-Gruppe wurden solche Änderungen der Fluoreszenzintensitäten nicht festgestellt. Zwar erscheint die Akzeptorfluoreszenzintensität im Bild der

Donorfluoreszenzintensität ähnlich, die Ursache hierfür liegt jedoch im verwendeten Multi-Filter-Setting. Die bei unterschiedlichen Belichtungszeiten für Donor und Akzeptor entstandenen Bilder der Nitrozellulosemembran wurden von der Software übereinandergelegt, wodurch der Eindruck eines starken Akzeptorsignals entsteht. Die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten zeigt jedoch das dies nicht der Fall ist.

Beim Vergleich von FRET- und Kontroll-Paar ist besonders die registrierte Änderung des Akzeptorsignals von entscheidender Bedeutung. Der enorme Unterschied zwischen FRET-Paar, bei welchem ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz bei Anwesenheit des Donors im Vergleich zur Akzeptorfluoreszenz allein auf 818% verzeichnet wurde, und Kontroll-Paar, mit einer Änderung der Akzeptorfluoreszenz bei Anwesenheit des Donors im Vergleich zur Akzeptorfluoreszenz allein auf 98%, ist dabei mehr als deutlich. Somit bildet der Vergleich der beiden Gruppen den Nachweis der stattgefundenen Energieübertragung mittels FRET. Das verwendete System kann damit in den nächsten Stufen der Experimente angewendet werden.

Da diese weiteren Stufen Versuche *in vitro* und *in vivo* beinhalten und das System auch für die spätere klinische Anwendung geeignet sein soll, ist eine Beurteilung der Zytotoxizität von Bedeutung. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Dyomics wurden bereits durch Pauli et al. (Pauli et al. 2009) auf ihre Zytotoxizität hin untersucht. Dabei wurde die Wirkung der Fluoreszenzfarbstoffe auf Endothelzellen und Makrophagen betrachtet, da diese beiden Zelltypen im Gefäßsystem direkt mit den späteren Sonden in Berührung kommen und somit dem größten zytotoxischen Stress ausgesetzt sind. Es stellte sich heraus, dass die von Dyomics produzierten Fluoreszenzfarbstoffe eine sehr geringe Zytotoxizität aufweisen. Verglichen wurde die Zytotoxizität der DY's DY-676, DY-681, DY-731, DY-751 und DY-776 mit der von ICG, welches aktuell klinische Anwendung findet. Als Ergebnis wurde dabei gefunden, dass alle verwendeten DY's eine deutlich geringere Zytotoxizität als ICG aufweisen. Da die von Pauli et al. untersuchten DY's eine stark ähnliche Struktur zu denen in dieser Arbeit verwendeten Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffe haben, sind diese nicht nur für *in vitro* und *in vivo* Versuche geeignet, sondern würden auch einen deutlichen Vorteil in der künftigen klinischen Anwendung der Fluoreszenzfarbstoffe mit sich bringen (Pauli et al. 2009).

Vor dem Übergang zu den *in vitro* und *in vivo* wurde noch untersucht, in wieweit sich die Kopplung von IgG an den Fluoreszenzfarbstoff auf seine Fluoreszenz auswirkt. Beim Vergleich des IgG-gekoppelten mit dem freien Farbstoff auf Nitrozellulosemembran wurde eine deutlich verstärkte Fluoreszenzintensität des IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes

(um den Faktor 3) festgestellt. Diese Zunahme der Fluoreszenzintensität ist möglicherweise auf eine veränderte räumliche Anordnung der Farbstoffmoleküle untereinander zurückzuführen. Die Proteine, welche an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt wurden, sorgen dafür, dass es zu weniger Stoßprozessen zwischen den in der Lösung enthaltene Quenchern wie Salze und den Fluoreszenzfarbstoffen kommt. Damit wird weniger Energie durch Übertragung auf nicht fluoreszierende Moleküle verloren und kann somit als Photonen abgegeben werden (Lakowicz 1999). Eine weitere Ursache für die zunehmende Fluoreszenzintensität könnte die veränderte Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes durch Kopplung mit den IgG-Molekülen sein. Kann sich der Farbstoff besser in einer Lösung verteilen, und bildet er keine Konglomerate, verringert sich der Effekt des Quenchings ebenfalls (Lakowicz 1999). Dies bedeutet, dass für die weiteren Versuche bei Verwendung des IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes geringere Stoffmengen ausreichen um eine deutliche Fluoreszenz hervorzurufen als beim freien Farbstoff.

Des Weiteren wurde mittels einer Konzentrationsreihe festgestellt, dass bei einer Konzentration von 0,23 nmol/µl die gefundene Signalstärke am größten war. Offenbar sind die auftretenden Quenching-Effekte bei dieser Konzentration minimal. Das erreichte Verhältnis zwischen steigender Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes und zunehmenden Quenchingeffekten ist hier optimal und ermöglicht maximale Fluoreszenz. Der räumliche Abstand der Fluorophore untereinander und auch zu den in der Lösung enthaltenen Quenchern wie Salzen und anderen Molekülen scheint hier groß genug zu sein, dass durch Stoßprozesse nur minimal Energie verloren geht. Stattdessen wird die Energie in Form von detektierbaren Photonen abgegeben. Für die weiteren Versuche sollte also die eingesetzte Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe immer deutlich unterhalb dieser Grenze liegen, damit Quenchingeffekte die Fluoreszenzintensitäten nicht beeinflussen. Besonders bei der Detektion des Akzeptorsignals ist dies essentiell. Eine Abschwächung des Signals durch Quenching könnte einen eventuellen Anstieg des Signals überdecken und somit den Nachweis von FRET erschweren oder verhindern.

Der hier ebenfalls festgestellte Unterschied zwischen den verschiedenen Lösungsmitteln bei der weiteren Verdünnung des freien Fluoreszenzfarbstoffes könnte seine Ursache zum einen darin haben, dass das Ausgangslösungsmittel DMF darstellt. Bei einer weiteren Verdünnung mit einem wässrigen Lösungsmittel wie Medium oder Aqua dest. kann es zu einer ungünstigeren Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes kommen, der zunächst in den sich bildenden kleinen DMF-Partikeln verbleibt und hier eine starke räumliche Nähe zueinander einnimmt. Es würde somit in diesen Partikeln zu starken Quenching-Effekten kommen. Der

zusätzliche Unterschied zwischen destilliertem Wasser und Medium könnte daher rühren das neben dem oben beschriebenen Effekt durch Zugabe eines wässrigen Lösungsmittels im Medium zusätzlich 10% fetales Kälberserum enthalten ist. Dieses enthält eine große Menge verschiedenster Proteine, welche als Quencher in der Lösung fungieren könnten. Das destillierte Wasser hingegen enthält deutlich weniger Moleküle, welche Quenching hervorrufen könnten (Lakowicz 1999).

Die daraufhin folgende Stufe der Experimente umfasste die *in vitro* Untersuchungen der Fluoreszenzfarbstoffe. Der bereits auf der Nitrozellulosemembran beobachtete FRET-Effekt konnte hier in den behandelten Makrophagen, welche in Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen, wiedergefunden werden. Es gelang also nicht nur einfach das Fluoreszenzsignal der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe in den Zellen nachzuweisen, sondern auch der Nachweis von FRET durch den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz beim FRET-Paar DY-682/DY-782 entgegen dem Kontroll-Paar. Es muss sich also eine ausreichende räumliche Nähe zwischen Donor und Akzeptor eingestellt haben, damit eine solche Energieübertragung möglich wurde. Die Vermessung der Überstände nach dem Waschen mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager zeigte keinerlei Fluoreszenz mehr. Das aufgefangene Signal muss somit aus den Zellen selbst stammen. Der Farbstoff wurde also von den Makrophagen wie erwartet aufgenommen.

Bei der Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe durch die Makrophagen handelt es sich am ehesten um Rezeptor vermittelte Endozytose. Der Fc-Teil des an den Farbstoff gekoppelten IgG's bindet dabei an den Fc-Rezeptor der Makrophagen. Dieser befindet sich in der Plasmamembran und initialisiert eine phagozytäre Reaktion. Es werden dabei Aktin- und Myosinfilamente in der Anwachsenden Schale konzentriert. Durch Kontaktion, Polymerisation und Depolymerisation des Aktin-Myosin-Netzwerkes kommt es hierbei zur weiteren Ausstülpung der Plasmamembran um den Farbstoff herum. Die entstandene Membranausstülpung umschließt schließlich den Farbstoff und bildet so innerhalb von 7 min ein sogenanntes Phagosom. Dieser Prozess wird in Abbildung 45 illustriert. Innerhalb der nächsten Stunde verbindet sich das Phagosom mit anderen membranösen Organellen der Zelle (Swanson und Hoppe 2004). Eine Untersuchung ob dieser Prozess für die Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe verantwortlich ist, könnte über die Verwendung von spezifischen Hemmstoffen bei weiteren Versuchen erfolgen.

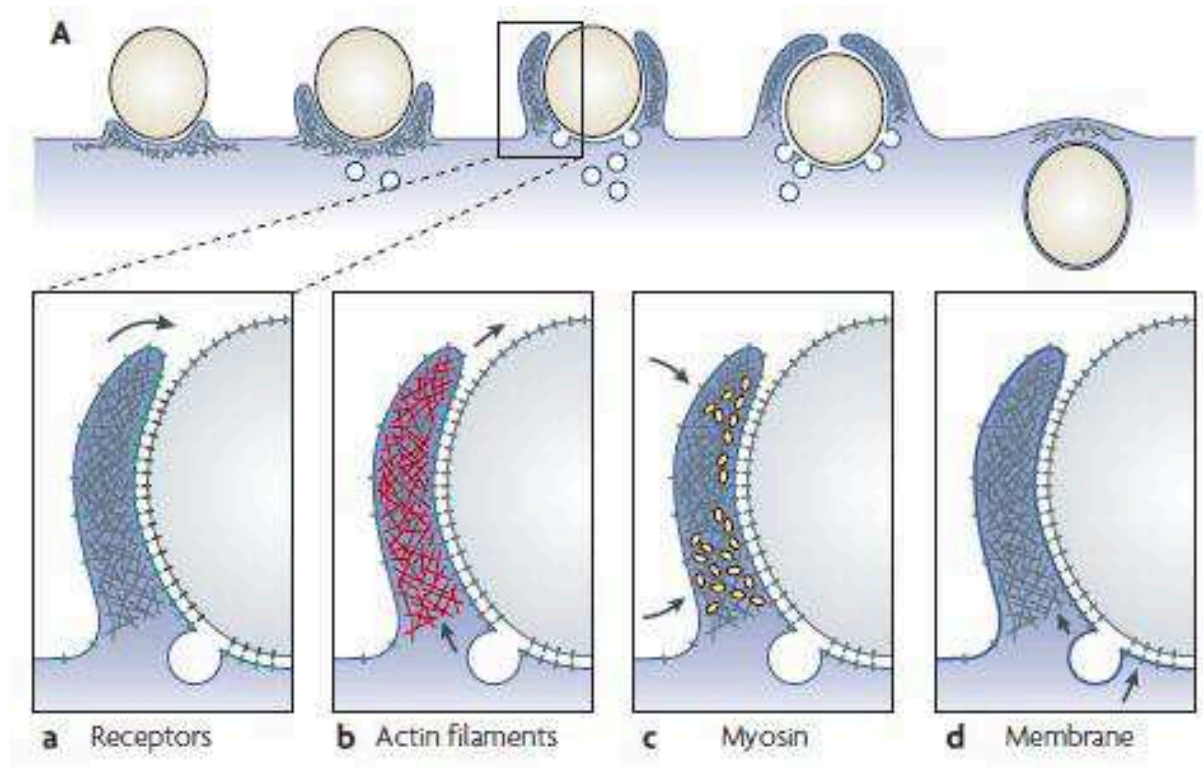


Abbildung 45: Der Prozess der Phagozytose. A) Während Fc-Rezeptorvermittelter-Phagozytose stülpt sich die Plasmamembran wie eine Schale um den Partikel. Durch progressive Interaktion des FcR (grün; Aa) mit dem Partikel-gebundenen-Immunglobulin G (schwarz; Aa) werden Aktin (rot; Ab) und Myosin (gelb; Ac) in der anwachsenden Schale konzentriert und Membran (blau; Ad) aus dem intrazellulären Kompartiment wird in die Basis der Schale eingebaut. Die Pfeile zeigen die Richtung der Rezeptorbewegung (Aa), die Netzverschiebung der Actinfilamente durch Polymerisation, Depolymerisation und Kontraktion (Ab), die Kontraktion des Aktin und Myosin Netzwerkes (Ac) und das einströmen des Membrannetzes (Ad) (Swanson 2008).

Es zeigt sich zwar, dass auch der freie Farbstoff von den Makrophagen aufgenommen wird und in den Zellpellets nachweisbar ist, jedoch ist die dabei gefundene Signalstärke deutlich geringer als die beim gekoppelten Farbstoff. Diese Diskrepanz ist nach Meinung des Autors dieser Arbeit nicht allein auf die bereits untersuchte stärkere Fluoreszenz des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes zurückzuführen (hier wurde eine Steigerung bei gleicher Stoffmenge um den Faktor 2 bis 4 gefunden). Es handelt sich vielmehr um einen weiteren Hinweis darauf, dass der IgG-gekoppelte Farbstoff über einen aktiven Prozess wie den oben beschriebenen Rezeptorvermittelt aufgenommen wird. Vergleicht man beispielsweise die Signalstärke zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 allein so ist diese beim IgG-gekoppelten etwa um den Faktor 26,5 höher. Bedenkt man dazu, dass vom IgG-gekoppelten Farbstoff eine deutlich geringere Konzentration genutzt wurde um die Makrophagen damit zu inkubieren, muss es zu einer extremen Steigerung der Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes kommen. Dies kann nur durch einen solchen rezeptorvermittelten Prozess hervorgerufen werden.



## DISKUSSION

---

Dass der Farbstoff tatsächlich in den Zellen zu finden ist, konnte mittels CLSM Untersuchung gezeigt werden. Bei der Darstellung der Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 zeigte sich, dass der Zellkern ausgespart wird. Hätte die Sonde unspezifisch außen an der Zelle gebunden, müsste das Signal gleichmäßig über die Oberfläche der Zelle verteilt sein. Es zeigt sich jedoch das das Signal ausschließlich in Bereichen des Zytoplasmas nachweisbar ist. Es muss sich somit in der Zelle selbst befinden. Der Fluoreszenzfarbstoff ist dabei diffus über das Zytoplasma verteilt. Dadurch wird die Vermutung, dass sich der Farbstoff in Endosomen befindet, bestärkt. Vergleicht man des Weiteren die Bilder der „The Rosanian Research Group“ der Universität Michigan, welche in einer ihrer Arbeiten (The Rosanian Research Group 2010) Lysosomen mittels eines gelben Farbstoffes zunächst angefärbt haben und schließlich diese mit Hilfe von Chloroquine haben anschwellen lassen, mit den CLSM-Bildern dieser Arbeit (Abbildung 46), so findet man deutliche Übereinstimmungen, welche den Schluss nahe legen, dass es sich bei der Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffes in den Makrophagen der hier vorliegenden Arbeit um ein äquivalentes Zellorganell wie die von der „The Rosanian Research Group“ dargestellten Lysosomen handelt, also Endosomen oder ebenfalls Lysosomen.

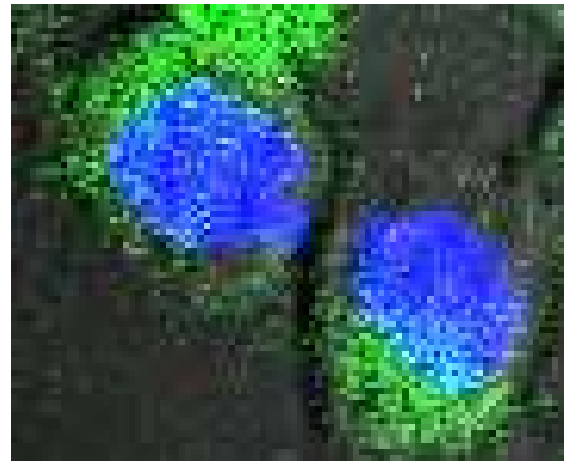
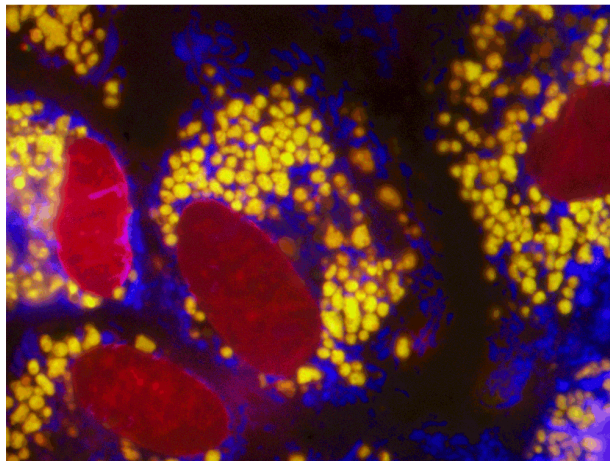


Abbildung 46: Vergleich der mit gelbem Farbstoff gelabelten Lysosomen von MDCK-Zellen mit den CLSM-Bildern der mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-682 inkubierten Makrophagen dieser Arbeit. Links: Bild von MDCK-Zellen der „The Rosanian Research Group“ der Universität Michigan. Verwendet wurden drei verschiedene Farbstoffe zum Anfärben von Zellorganellen. Rot = DNA, Blau = Mitochondrien, Gelb = Lysosomen, nach Anfärbung der Organellen wurden die Zellen mit Chloroquin inkubiert um zu einer Vermehrung und einem Anschwellen der Lysosomen zu führen; Rechts: CLSM-Bild der mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-682 inkubierten Makrophagen dieser Arbeit, die Zellen wurden für 24 h mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert und anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff gegengefärbt, daraufhin wurden die Zellen fixiert und mittels CLSM vermessen. Hoechst-Farbstoff = Anregung: 365 nm, Detektion: 450 nm longpass; Fluoreszenzfarbstoff = Anregung: 633 nm, Detektion: 650 nm longpass.

FRET-Effekte konnten aufgrund der aktuellen technischen Einschränkungen der CLSM Technik nicht nachgewiesen werden, da nur Spektren bis zu einer Wellenlänge des Lichtes von 750 nm aufgenommen werden können. Da jedoch der Fluoreszenzfarbstoff DY-782, welcher in beiden Paaren als Akzeptor dient, ein Emissionsmaximum bei 800 nm besitzt, war es nicht möglich diesen darzustellen. Die gewonnenen Fluoreszenzspektren konnten somit nicht in Donor- und Akzeptor-Spektrum aufgeteilt werden. Eine Darstellung von FRET könnte allerdings mittels des Nuance<sup>TM</sup>-Gerätes gelingen. Hierbei handelt es sich um ein so genanntes multi-label imaging system, welches ähnlich dem Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager verschiedene Fluoreszenzspektren erkennen, voneinander trennen und anschließend separat darstellen sowie vermessen kann (CRI Inc. 2010). Allerdings ist dies durch Anschluss an ein Mikroskop auch in Zellen und Geweben möglich. Mit dieser Technik könnten nicht nur alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sondern auch der FRET-Effekt in den (eventuell lebenden) Zellen nachgewiesen werden. Damit wäre ein Live-Imaging möglich, welches, besonders bei einer späteren Darstellung von Protein-Interaktionen mittels dieses Systems, interessante Einblicke in deren Ablauf liefern könnte.

Es hat sich somit gezeigt, dass das verwendete FRET-System geeignet ist um Fluoreszenz und Energieübertragung auch in einem lebenden System nachzuweisen. Der Nachweis des FRET-Effektes war trotz der Störquellen, welche ein lebendes System bietet (beispielsweise Autofluoreszenz, auftreten unbekannter Quencher, mögliche über die Zeit zunehmende Destruktion von Fluoreszenzfarbstoff und Sonde, Interaktionen mit ablaufenden Enzymprozessen) weiterhin möglich. Die Fluoreszenzfarbstoffe können also in die Stufe der in vivo Versuche übernommen werden.

Diese vorerst letzte Stufe der Experimente wurde noch einmal in zwei Phasen unterteilt. Die erste Phase untersucht dabei, ob die Fluoreszenzfarbstoffe auch durch die Haut von lebenden Versuchstieren hindurch dargestellt werden können.

Es zeigte sich dabei nach lokaler Applikation der inkubierten Zellen, dass sich auch hier FRET gut nachweisen lässt. In der Kontroll-Gruppe ist im Vergleich zur FRET-Gruppe keine Änderung des Akzeptorsignals zu finden. Eine solche Darstellung von FRET im Tierversuch ist nach Kenntnis des Verfassers dieser Arbeit noch nicht erfolgt.

Trotz der Autofluoreszenz der Tiere ließen sich die meisten Fluoreszenzfarbstoffe auch durch die Haut der Tiere hindurch gut darstellen. Lediglich ein Nachweis des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 auf dem Rücken der Tiere gelang nicht. Dennoch konnte durch die festgestellten Unterschiede der Akzeptorfluoreszenz, sowohl in der FRET-Gruppe zwischen Farbstoff allein und Paar, sowie zwischen FRET- und Kontroll-Gruppe der Nachweis von FRET erbracht

werden. Das tatsächliche Vorhandensein des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 konnte post mortem an den Tieren nachgewiesen werden, da das Signal in heraus präparierten Pellets gefunden werden konnte. Die Nichtnachweisbarkeit des Farbstoffes DY-505 liegt dabei unter anderem an der starken Autofluoreszenz der Maus selbst. In der bereits in der Einleitung gezeigten Abbildung 3 ist deutlich zu erkennen, dass im Bereich von 500 nm die Fluoreszenz von Hämoglobin und Hämoglobin-O<sub>2</sub> sehr stark ist. Somit überstrahlen diese den verwendeten Farbstoff. Außerdem könnte der Effekt der Streuung, welcher eine Verschiebung der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes bewirkt und somit besonders am Beginn des Aufgezeichneten Spektrums auftritt, das eigentliche Fluoreszenzsignal überdecken. Die Verwendung eines Filtersystems, welches eine Aufzeichnung des Fluoreszenzspektrums weiter links im Lichtspektrum ermöglicht, könnte dieses Problem beheben. Solche Filter stehen für den Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager derzeit nicht zur Verfügung, da das Gerät nur in einem Wellenlängenbereich des Lichtes von 500 nm bis 950 nm detektiert. Isoliert man jedoch die Zellpellets wieder aus der Maus tritt das vorher unterdrückte Signal wieder hervor. Der Farbstoff ist somit also eindeutig vorhanden und dennoch ist keine Änderung der Fluoreszenz des Akzeptors zu verzeichnen. Folglich kommt es nicht zur Energieübertragung zwischen diesen beiden.

Die bereits angesprochene Streuung beeinflusst auch die ideale Isolierung des DY-682-Signals. Dies könnte jedoch durch Herstellung eines speziell für diese Zwecke geeigneten Filter-Sets umgangen werden. Dieses Filter-Set müsste ein Excitationsspektrum von 600 nm bis 650 nm und ein Emissionsspektrum ab 670 nm aufweisen. Die Aufzeichnung würde dadurch weiter links im Spektrum beginnen und auch die Streuung weiter aus dem aufgenommenen DY-682-Spektrum verschoben werden. Abgestimmt werden müssten noch die genauen optimalen Verhältnisse damit durch das erzeugte Licht eine ausreichende Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 erzeugt wird und gleichzeitig durch den Emissionsfilter das gesamte Excitationslicht abgeschnitten wird.

Es zeigte sich nach den durchgeführten Experimenten, dass das entwickelte System geeignet ist um in einem komplexen lebenden Organismus eingesetzt zu werden. Die Durchdringungstiefe der Fluoreszenz ist ausreichend, um die Haut der Tiere problemlos zu durchdringen. Umar Mahmood und Ralph Weissleder beziffern dabei die mögliche Durchdringungstiefe für NIRF durch Gewebe mit 10 bis 15 cm (Mahmood und Weissleder 2003). Somit könnten auch deutlich tiefer gelegene Bereiche innerhalb des Körpers dargestellt werden. Nimmt man beispielsweise den Umfang einer standardisierten Blutdruckmanschette (30 bis 42 cm) als Grundlage, gelangt man in etwa zu einem Armdurchmesser von 9 bis 14

## DISKUSSION

---

cm. Der Arm könnte also laut Mahmood und Weissleder von den Fluoreszenzfarbstoffen problemlos durchdrungen werden. Verwendet man dazu noch ein System aus mehreren Kameras, welche das Objekt von oben und von unten vermessen, könnten sogar Objekte mit einem maximalen Durchmesser von 30 cm gescannt werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe in jede Richtung leuchten. Wie in Abbildung 47 gezeigt könnte auf diese Weise die Eindringtiefe des Fluoreszenzlichtes der Fluoreszenzfarbstoffe in weiteren Versuchen oder einer späteren Anwendung optimal ausgenutzt werden. Durch geeignete Rechenprogramme und die Anbringung weiterer Kameras in verschiedenen Ebenen könnte des Weiteren die Lokalisation des Farbstoffes in dem untersuchten Objekt ermittelt werden.

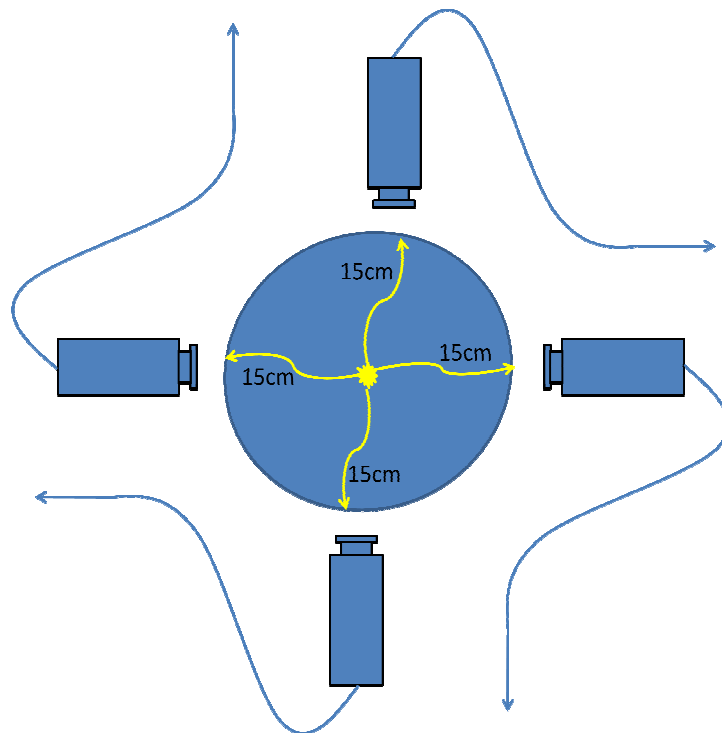


Abbildung 47: Ein hypothetisches System mit mehreren Kameras, welches es ermöglichen würde die Eindringtiefe der Farbstoff optimal auszunutzen. Durch Platzierung mehrerer gegenüberliegender Kameras würde die Durchdringtiefe der Nahinfrarotfluoreszenz der Farbstoffe in jede Richtung maximal 15 cm betragen und es somit ermöglichen Objekte mit einem Durchmesser von bis zu 30 cm zu durchstrahlen.

Die im durchgeführten in vivo Experiment festgestellte Abnahme des Signals in den Pellets über die Zeit lässt sich entweder durch eine Auswanderung der zur Migration befähigten Makrophagen oder durch einen Abbau des Fluoreszenzfarbstoffes in den Phagosomen der Makrophagen erklären. Innerhalb einer Stunde nach Entstehung des Phagosoms verbindet sich dieses mit anderen Organellen der Zelle (vor allem Lysosomen). Dadurch ändert sich die chemische Zusammensetzung im Inneren des Phagosoms. Es entsteht ein hoch saures Milieu aufgrund von sauren Hydrolasen, welches in den meisten Fällen zur Degeneration der im

Phagosomen enthaltenen Substanzen führt. Auf diese Weise laufen in den so veränderten Phagosomen Verdauungsprozesse ab (Swanson und Hoppe 2004). Es ist durchaus möglich, dass der Fluoreszenzfarbstoff dabei auf die Dauer seine Fluoreszenzeigenschaften verliert. Da sich nach und nach immer mehr Phagosomen mit Lysosomen verbinden nimmt die Menge an intaktem Fluoreszenzfarbstoff über die Zeit kontinuierlich ab.

Der gefundene kurzzeitige Anstieg des DY-782-Signals in der Gruppe DY-682/DY-782 vom Zeitpunkt der Injektion bis 30 min danach ist wahrscheinlich auf Quenching-Effekte zurück zu führen. Offenbar enthielt das Pellet zum Zeitpunkt der Injektion noch zu viel Fluoreszenzfarbstoff, wodurch Energie zwischen den Fluoreszenzfarbstoffmolekülen weitergegeben wird, ohne dass ein Photon freigesetzt wird. Es kommt damit zu einem Effekt wie er bereits in den Ergebnissen des Versuchs 2.4.2.3. *Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe in bestimmten Konzentrationsbereichen* (Ergebnisse siehe 3.1.4. *Untersuchung des Quenchingeffektes und der Detektionsgrenze*) zu beobachten war. Erst nachdem einiger Fluoreszenzfarbstoff davon, zum Beispiel durch die oben beschriebenen Prozesse wie Migration und Verdauung, im Pellet verloren gegangen war, konnte sich das Signal vollständig entfalten. Es ist jedoch festzustellen, dass trotz Quenching auch zum Zeitpunkt der Injektion ein deutlicher Anstieg der Akzeptorfluoreszenz von Farbstoff Allein zum Paar zu verzeichnen ist. Das Quenching hat scheinbar auf die Nachweisbarkeit des FRET-Effektes keinen negativen Einfluss. Die für diesen Versuch ermittelten semiquantitativen Auswertungen zeigen zwar einen deutlichen Unterschied der Fluoreszenzintensitäten, wenn man den Fluoreszenzfarbstoff allein und im Paar miteinander vergleicht, jedoch war hier keine Signifikanz nachweisbar. Diese fehlende Signifikanz trotz deutlicher Unterschiede auch der Standardfehler der Mittelwerte ist auf die geringe Fallzahl von 3 Mäusen pro Gruppe zurückzuführen. Um hier einen Nachweis von Signifikanz erbringen zu können, müsste die Fallzahl erhöht werden.

Die zweite Phase der letzten Stufe umfasste die Untersuchung der Sonden in einem Entzündungsmodell. Das dabei mittels Zymosan generierte Ödem diente als lokaler Entzündungsherd, welcher durch die intravenös applizierten Sonden nachgewiesen werden sollte. Es zeigt sich, dass die Fluoreszenz genau am erwarteten Ort, hier im Ohr der Maus, zu finden ist. Das erarbeitete System ist also in der Lage eine lokale Entzündung nach systemischer Applikation der Sonde nachzuweisen. Ebenfalls gelang hier der Nachweis von FRET. Der Anstieg der Akzeptorfluoreszenz beim FRET-Paar DY-682/DY-782 im Vergleich zur Kontrolle DY-505/DY-782 ist auch hier wieder eindeutig nachweisbar. Es stellt sich also zwischen den applizierten Sonden im Entzündungsgebiet eine ausreichende räumliche Nähe

ein, damit FRET-Effekte möglich werden. Ein solcher Nachweis einer Entzündung mittels FRET-Sonden und diese Art der Darstellung des FRET-Effektes ist nach Kenntnisstand des Autors dieser Arbeit bisher noch nicht erfolgt.

Offenbar gelangt der Farbstoff aus dem Blut der Tiere zielgerichtet in das Entzündungsgebiet und sammelt sich hier an. Dies lässt sich am ehesten damit erklären, dass vor allem Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, also zur Phagozytose befähigte Zellen im Blut, den Farbstoff aufnehmen und dann mit diesem beladen in das Entzündungsgebiet einwandern.

Die Zymosaninjektion ins Ohr induziert im Ohr der Maus eine Chemokinfreisetzung. Es wirkt über die verstärkte Genexprimierung von MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ). Dieses ist wichtig beim Prozess der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und anderen Entzündungszellen aus dem Blut ins Entzündungsgebiet (Ajuebor 1999). Durch die Aktivierung dieser Prozesse kommt es zur Einwanderung einer zunehmenden Anzahl von mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen. Eisenblätter et al. (Eisenblätter 2009) beschreiben die Migration von Makrophagen bei einer Entzündung. Dabei wurden die Makrophagen vorher ex vivo mit einem Fluorophor markiert und anschließend i.v. appliziert. Schließlich wurde eine Entzündung induziert und die Maus vermessen. Die Zellen wurden abschließend extrahiert. Am Ort der Entzündung wurden dabei mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Makrophagen gefunden. Somit wurde gezeigt, dass Makrophagen zielgerichtet aus dem Blut von Versuchstieren in den Ort einer Entzündung einwandern und sich dort ansammeln. Dies erhärtet die oben beschriebene Theorie zur Entstehung des Fluoreszenzsignals im Ödem.

Soehnlein und Lindbom (Soehnlein und Lindbom 2010) beschreiben die Initialphase der Entzündung auf die Art, dass bestimmte Monozyten im Blut die Endothelwand entlang kriechen und dabei deren Integrität beurteilen. Bei einer Gewebeschädigung oder Entzündungssignalen migrieren sie innerhalb kürzester Zeit aus dem Blutsystem ins geschädigte Gebiet. Sie produzieren hierauf Cytokine und Chemokine wodurch weitere Abwehrzellen (Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten) angelockt werden. Sie beschreiben weiterhin, dass eine solche Migration sowohl für septische als auch aseptische Gewebsschädigungen gezeigt wurde. Offensichtlich führen bestimmte Alarmsignale dazu, dass es zu einer solchen schnellen Auswanderung der Zellen aus dem Blut kommt. Auch beschreiben sie, dass neutrophile Granulozyten Träger von Fc-Rezeptoren sind. Diesen Zellen steht damit die Möglichkeit zur Verfügung die Sonden bereits Blutkreislauf zu phagozytieren, anschließend ins Entzündungsgebiet zu migrieren und hier das Fluoreszenzsignal zu verstärken. Der hier beschriebene Effekt würde das zunehmende Signal im

Entzündungsgebiet erklären. Die zunehmende und rasante Einwanderung von Makrophagen, Monozyten und auch neutrophilen Granulozyten, welche durch Fc-Rezeptoren zur Phagozytose der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe via Rezeptor vermittelter Phagozytose befähigt sind (siehe oben), führt damit zum anwachsenden Fluoreszenzsignal im Entzündungsgebiet. Außerdem erklärt es, dass bei einigen Mäusen eine zusätzliche Fluoreszenz in Bereichen aufgetreten ist, welche nicht mit Zymosan behandelt wurden. Die Mäuse hatten sich in diesen Arealen nach der Rasur selbst gekratzt und sich dadurch eigenständig eine Gewebsläsion zugefügt. Da die Auswanderung von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen auch unter aseptischen Bedingungen beschrieben wird (Soehnlein und Lindbom 2010), erklärt dies das zusätzliche Signal bei einigen Mäusen.

Die Geschwindigkeit, mit welcher die verschiedenen Entzündungszellen in ein Entzündungsgebiet einwandern, wurde von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht. Sayers et al. (Sayers et al. 1988) untersuchten bereits 1988 die Einwanderung von Neutrophilen in eine vorher induzierte Peritonitis. Dabei wurde festgestellt, dass bereits nach 30 min eine Zunahme der Zellzahl in der Peritoneallavageflüssigkeit zu finden ist. Auch Robson et al. (Robson et al. 2001) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie stellten nach Induktion einer Peritonitis eine Zunahme der in Peritoneallavagen gefundenen Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe fest.

Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen sind in Abbildung 48 dargestellt.

Underwood et al. (Underwood et al. 1995) stellten einen Zeitplan für die Einwanderung verschiedener Zellen in eine induzierte Entzündung der Atemwege auf. Dieser ist für die Gruppe der eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und der aktivierten Makrophagen in Abbildung 49 dargestellt. Dabei ist deutlich zu sehen, wie es zu einer vermehrten Einwanderung von Entzündungszellen über die Zeit kommt. Bei den neutrophilen Granulozyten ist ein Maximum der gefundenen Zellzahl bei 14 Stunden und bei den Makrophagen bei 24 h zu finden.

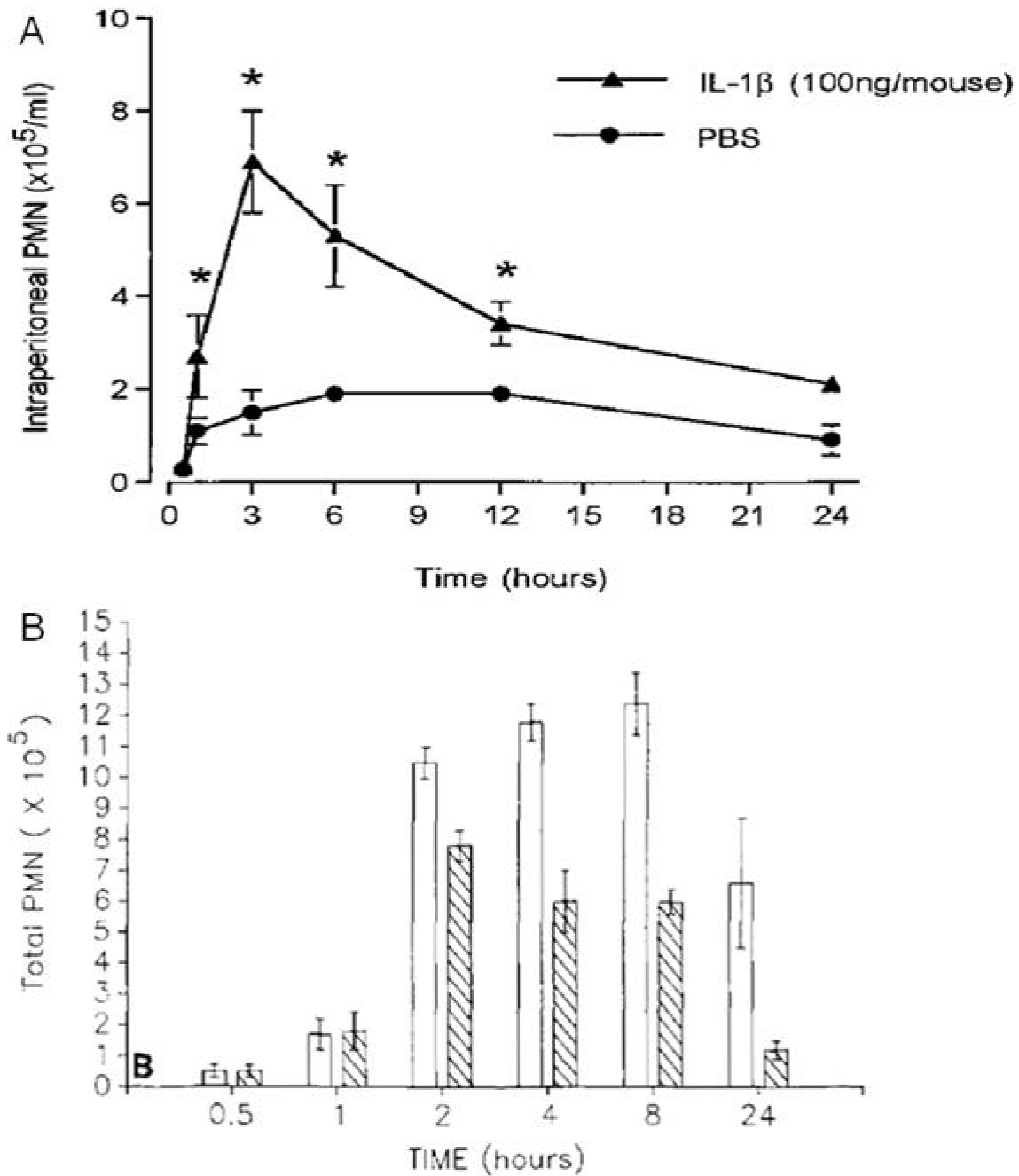


Abbildung 48: Untersuchungen zur Einwanderung von Polymorphonuclear leucocytes (PMN; polymorphkernige Leukozyten) in eine vorher induzierte Peritonitis. A: induziert wurde die Peritonitis durch die Injektion von IL-1 $\beta$  ins Peritoneum von Mäusen. Als Kontrolle wurde PBS injiziert. Gemessen wurde die in Peritoneallavagen gefundene Zellzahl an PMN zu festgelegten Zeiten (30 min bis 24 h). \*, signifikanter Anstieg im der PMN-Zahl nach IL-1 $\beta$  Injektion im Vergleich zu PBS. (Robson et al. 2001) B: Kinetik der PMN Einwanderung nach Gabe von verschiedenen inflammatorisch wirksamen Substanzen (weiß = rhIL-1 $\alpha$ ; schraffiert = rhTNF- $\alpha$ ). Aufgetragen ist die in Peritoneallavagen gefundene Zellzahl an PMN zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion. (Sayers et al. 1988)



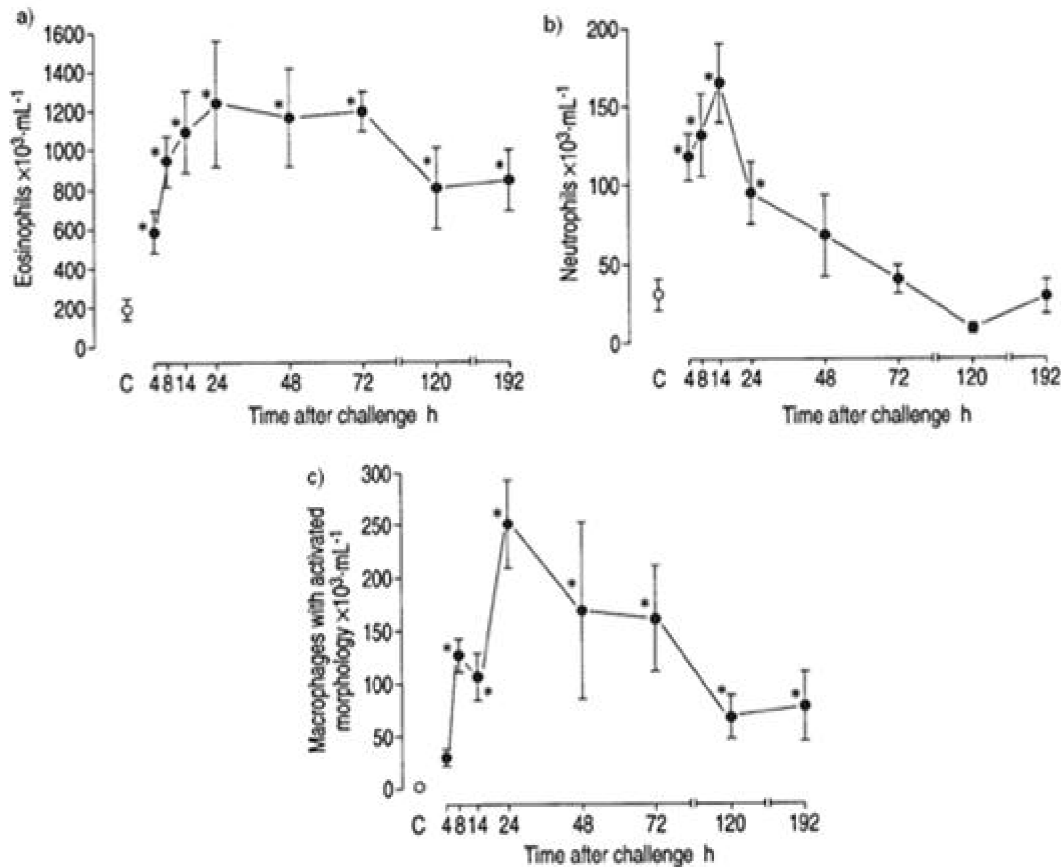


Abbildung 49: Zeitlicher Ablauf der Einwanderung von Entzündungszellen in ein entzündliches Gewebe. Bestimmt wurde die Zellzahl in Bronchoalveolärenlavagen nach Behandlung mit einem inhalativen Antigen (ovalbumin) bei sensibilisierten Meerschweinchen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* =  $p < 0,05$  verglichen mit den unbehandelten (C) Tieren. a) eosinophile, b) neutrophile und c) aktivierte macrophagen. (Underwood et al. 1995)

Die von diesen Arbeitsgruppen gefundenen und beschriebenen Einwanderungsgeschwindigkeiten von Entzündungszellen passt sehr gut zu den in dieser Arbeit beobachteten Zunahmen der Fluoreszenzen über die Zeit. Durch diese zunehmende Zahl von mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Entzündungszellen nimmt das Signal über die Zeit immer weiter zu.

Nach 6 Stunden zeigt sich in der FRET-Gruppe ein Abfall sowohl des Donorsignals im Paar als auch des Akzeptorsignals im Paar. Die Ursachen dafür sieht der Autor dieser Arbeit in der weiter zunehmenden Zellzahl und der damit auch größer werdenden Menge an lokal vorhandenem Farbstoff. Hierdurch kommt es zu einer Überschreitung der ermittelten Konzentration von  $0,23 \text{ nmol}/\mu\text{l}$  Fluoreszenzfarbstoffs und den bereits oben beschriebenen Quenchingeffekten. Daraus folgt eine Auslöschung und damit Verminderung des Fluoreszenzsignals.

Eine andere Erklärung für den beginnenden Abfall des Fluoreszenzsignals könnte die von Robson et al. festgestellte (siehe Abbildung 49) Kinetik der PMN Migration in entzündlichem Gewebe sein. Hier kann man deutlich einen Umschlagpunkt bei 3-6 Stunden erkennen. Nach dem bis dahin festgestellten Anstieg der Zellzahlen kommt es nun zu einem Abfall der gemessenen Zellzahlen. Eine Abnahme der Zellzahlen im Entzündungsgebiet würde natürlich mit einem Abnehmen der Menge an vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff korrelieren und somit den Abfall der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 6h erklären.

Da jedoch das Donor- und Akzeptorsignal allein stets über alle Zeiten ansteigt, ist das Auftreten von Quenching-Effekten nach Meinung des Autors wahrscheinlicher.

Ein Nachweis der eingewanderten fluoreszierenden Zellen in der Entzündung könnte erfolgen, in dem die Entzündung wie bei Eisenblätter et al. (Eisenblätter 2009) mittels eines Polyacrylamide Gelpellets mit Lipopolysaccharide oder aber in Abwandlung der bisherigen hier beschriebenen Versuche mittels eines Matrigelpellets mit Zymosan induziert wird. Dieses könnte dann leicht heraus präpariert werden und mikroskopisch untersucht werden. Eisenblätter et al. gelang auf die hier beschriebene Art die Darstellung der injizierten markierten Makrophagen.

Das hier beschriebene System hat damit bewiesen, dass es zur Darstellung von Entzündungen in vivo geeignet ist. Die theoretische Funktionsweise des Systems ist in Abbildung 50 grafisch dargestellt. Nach Injektion der Fluoreszenzfarbstoffsonden in die Schwanzvene der Tiere werden diese durch zur Phagozytose befähigte Zellen (vorwiegend Entzündungszellen wie: Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten) aufgenommen. Diese Entzündungszellen wandern anschließend durch den Blutkreislauf des Tieres. Durch im Entzündungsgebiet gebildete Chemokine werden sie aktiviert und angelockt, woraufhin sie aus dem Blut der Tiere heraus ins Entzündungsgebiet hinein migrieren. Hier sammeln sie sich an, so dass das von ihnen erzeugte Fluoreszenzsignal nach Anregung der in ihnen enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe ausreichend groß ist um mittels Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager aufgezeichnet zu werden.

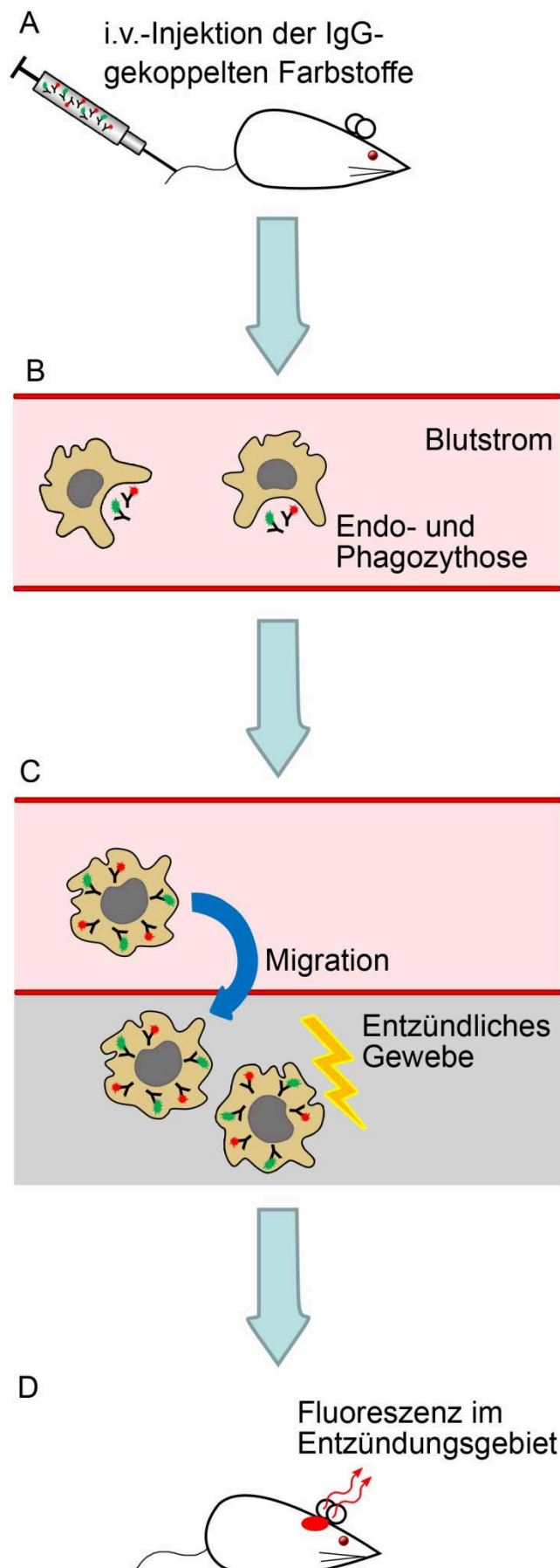


Abbildung 50: Schema zu den ablaufenden Prozessen nach intravenöser Applikation der Farbstoffsonden. (A) Zunächst erfolgt die intravenöse Injektion der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Diese gelangen somit in den Blutstrom der Tiere (B). Hier werden sie von im Blut schwimmenden zur Phagozytose befähigten Zellen (Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten) aufgenommen. Anschließend wandern diese Zellen aufgrund eines Entzündungssignals aus dem Blut ins entzündliche Gewebe aus (C). Auf diese Weise gelangt der in den Zellen enthaltene Farbstoff zum Ort der Entzündung und liefert nun dort nach Anregung ein Fluoreszenzsignal (D).

### 4.1. Ausblick

Es steht damit also ein Tool zur Verfügung, welches es ermöglicht FRET-Effekte in einer ablaufenden Entzündung darzustellen. Damit wird die Möglichkeit geboten, einen Einblick in die aktuell ablaufenden Prozesse einer Entzündung zu erlangen, indem das hier verwendete unspezifische IgG gegen spezifische Antikörper ausgetauscht wird. Die Interaktionen diverser Proteine könnten dadurch sichtbar gemacht werden.

Es bietet sich die Möglichkeit Entzündungsprozesse auf der Ebene der Proteininteraktion zu beobachten und somit neue Erkenntnisse über die Abläufe während einer solchen Reaktion zu erlangen. Hierdurch könnte außerdem der Zusammenhang zwischen chronischen Entzündungen und Tumorentstehung genauer betrachtet werden.

Ein potentiell Target für diese weitere Anwendung wäre zum Beispiel NF- $\kappa$ B (Majdalawieh und Ro 2010). Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher an verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt ist. Die wichtigste Aufgabe besteht jedoch darin eine effektive Entzündungsreaktion gegen virale oder bakterielle Infektionen zu induzieren. NF- $\kappa$ B ist dazu an der Steuerung von mehr als 50 Genen über Promotor- und Enhancer-Regionen und außerdem an der Transaktivierung verschiedener anderer Gene wie etwa für TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-6 und vielen mehr beteiligt. Des Weiteren ist die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (activator protein-1), welches für die Hochregulation einiger MMP's zuständig ist, bekannt. Diese MMP's spielen eine wichtige Rolle in der Destruktion artheroskleröser Plaques und damit deren Ruptur. NF- $\kappa$ B liegt normalerweise inaktiv im Zytosol vor und ist dabei an spezifische Inhibitoren gebunden (I- $\kappa$ B). An seiner Aktivierung sind nach bisherigem Wissensstand verschiedenste Kinasen wie die Proteinkinase A (Zellkerntranslokation und DNA-Bindung) und Proteinkinase C (Transaktivierungsfähigkeit) beteiligt. Besonders diese regulatorischen Schnittpunkte an denen die beschriebenen Kinasen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine enge räumliche Beziehung mit diesem eingehen müssen, bieten die Möglichkeit zur Darstellung dieser Prozesse mittels FRET

Ein komplexerer Zusammenhang der Regulation von NF- $\kappa$ B ist in Abbildung 51 als Gesamtschema dargestellt. Damit eröffnen sich diverse Anwendungsmöglichkeiten für die Untersuchung und Darstellung mit dem in dieser Arbeit beschriebenen FRET-System. Durch Kopplung des Donors und des Akzeptors an spezifische Antikörper für die verschiedenen Wege von NF- $\kappa$ B kann der Nachweis verschiedenster Prozesse erfolgen. Eine Kombination von PKA und NF- $\kappa$ B könnte zur Darstellung von ablaufenden Entzündungen dienen. Auch eine Kombination von PKC und NF- $\kappa$ B wäre für einen solchen Nachweis geeignet.

## DISKUSSION

Kombinationen aus NF- $\kappa$ B und AP-1 könnten bei der Darstellung von artherosklerösen Plaques und möglicherweise zur Einschätzung deren Rupturgefahr dienen. Eine andere Möglichkeit wäre die Kombination von I- $\kappa$ B und NF- $\kappa$ B. Trennen sich die beiden voneinander und wird somit eine Entzündungsreaktion getriggert, verschwindet das vorher vorhandene FRET-Signal, da die räumliche Nähe der beiden nicht mehr gegeben ist.

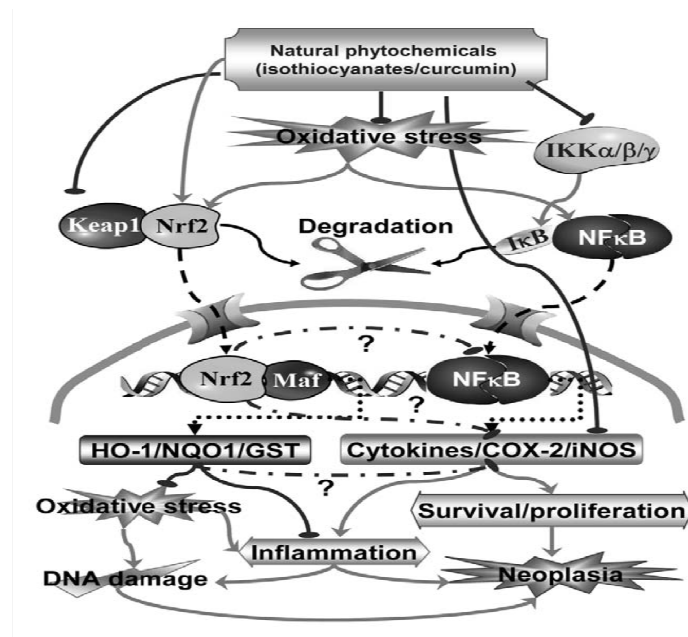


Abbildung 51: Gesamtschema von möglichen Wechselwirkungen zwischen NF $\kappa$ B und Entzündungssignalwegen bei der Entstehung und Progression von Neoplasien. Exzessiver oxidativer Stress gekoppelt mit verlängerten oder chronischen Entzündungsreaktionen führt zur Entstehung und dem Voranschreiten von Krebserkrankungen. Eine Blockierung des NF $\kappa$ B-Weges mittels natürlicher Phytochemicals führt zu einer Verminderung von Entzündung und Krebsentstehung. (Khor et al. 2008)

Auch der Leukotrien-Pathway stellt eine Möglichkeit für die Anwendung des beschriebenen FRET-Systems zur Darstellung von Entzündungsprozessen dar. Die 5-Lipoxygenase (5-LO) stellt dabei aus Arachidonsäure Leukotriene her, welche wichtige Funktionen als Chemokine bei Entzündungen übernehmen. Dazu muss die 5-LO jedoch an das 5-Lipoxygenase-activating-protein (FLAP) gebunden sein. Dies geschieht im Fall verschiedener entzündungsbedingter Stimuli. Abbildung 52 stellt schematisch den Ablauf des Leukotrienweges über 5-LO und FLAP dar (Funk 2005). Eine Kombination von an spezifische Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen zur Darstellung von 5-LO und FLAP und das bei einer Bindung, und damit engen räumlichen Nähe, der beiden Proteine entstehende FRET-Signal, könnte zum Nachweis einer ablaufenden Entzündungsreaktion dienen.

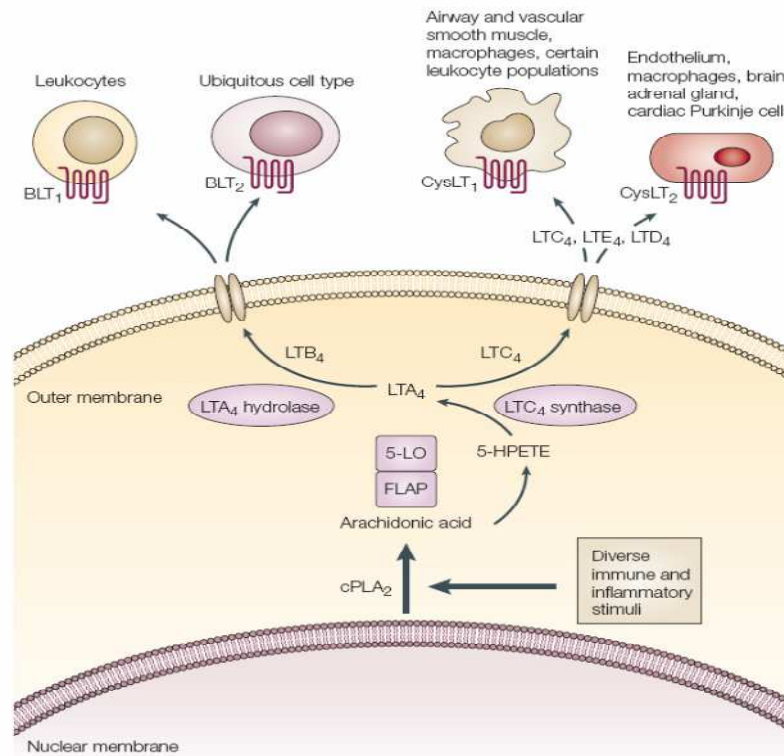


Abbildung 52: Schematische Darstellung des Leukotrienbiosyntheseweges. Durch verschiedene immune und entzündliche Stimuli kommt es zur Bindung von FLAP an 5-LO. Durch die dadurch erfolgte Aktivierung der 5-LO wandelt diese Arachidonsäure in Leukotriene um, welche auf verschiedenste Weise unterschiedliche Zellen der Immunabwehr beeinflusst und aktiviert. (Funk 2005)

Für die beschriebenen weiterführenden Anwendungen des hier beschriebenen FRET-Systems werden Möglichkeiten benötigt um die IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe aus den Endosomen ins Zytoplasma und damit zu den möglichen Targets zu bringen.

Varkouhi et al. beschreiben in ihrer Arbeit (Varkouhi et al. 2010) verschiedene Methoden um Substanzen, welche zur Anwendung in der Zelle bestimmt sind, aus den Zellendosomen frei zu setzen. Sie beschreiben Möglichkeiten des Poreneinbaus, der Fusion (dabei werden Substanzen verwendet, welche eine Fusion mit der Endosomenmembran eingehen und diese dadurch destabilisieren) und des Protonen-Schwammes (hier wird für eine Einwanderung von Protonen in die Endosomen gesorgt, welche Wasser nach sich ziehen und somit zum schwellen und platzen der Endosomen führen). Dafür stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung. Diese müssten jedoch vor allem auf ihre Interaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen und mögliche destruktive Wirkungen an den gekoppelten IgG-Molekülen sowie ihre Zytotoxizität in vivo hin überprüft werden.

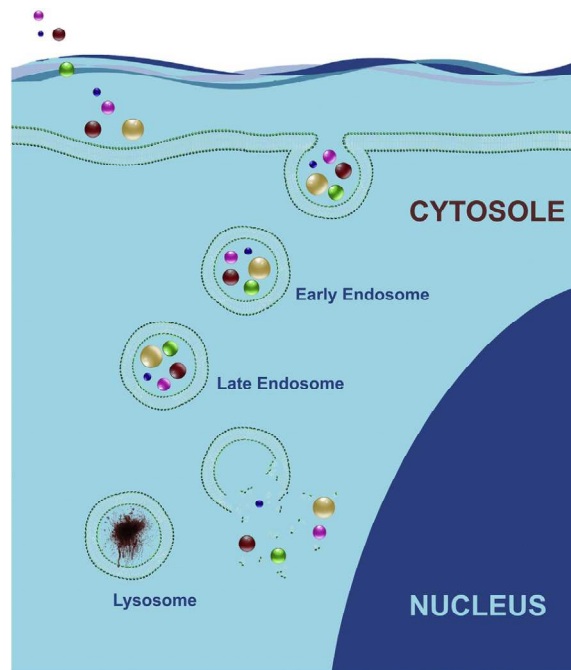


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Internalisierung von verschiedenen Substanzen zur in die Zelle via Endozythose sowie eine zwischengeschaltete endosomalen Freisetzung. Frühe Endosomen (Early Endosomes) enthalten die von der Zelloberfläche kommenden Substanzen. Späte Endosomen (Late Endosomes) durchliefen bereits einen Vorgang der Sortierung und stehen kurz vor der Interaktion mit Lysosomen. Lysosomen welche den letzten Schritt des Endozythoseweges darstellen, enthalten hydrolytische Enzyme, welche den Inhalt der Endosomen verdauen. Deshalb sollten die zur Anwendung in der Zelle bestimmten Substanzen vor der Verdauung durch die Lysosomen aus den Endosomen freigesetzt werden. (Varkouhi et al. 2010)

Wie bereits beschrieben besteht ein großer Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und Entzündung. Versteht man die durch Entzündung bedingte Tumorgenese, können sich dabei auch neue Targets für die Therapie solcher Erkrankungen ergeben.

Ebenfalls ist der Einsatz als diagnostisches Werkzeug im klinischen Alltag denkbar. Durch eine Darstellung von Entzündungsreaktionen auf molekularer Ebene würde die Diagnostik von entzündlichen Prozessen deutlich verbessert werden. Entzündungen könnten damit diagnostiziert werden bevor es zu morphologischen Veränderungen der Organe oder Gewebe kommt. Damit würde eine effektive Therapie sehr viel zeitiger begonnen werden können als es bisher möglich ist und Ursachen von Erkrankungen könnten genauer oder überhaupt diagnostiziert werden. Das Auskommen der Patienten würde sich damit drastisch verbessern lassen. So könnten zum Beispiel Krankheiten wie Morbus Bechterew deutlich zeitiger erkannt werden. Die Patienten könnten früher einer adäquaten Therapie zugeführt werden und somit ihre Leistungs- und Arbeitsfähigkeit länger erhalten bleiben.

Des Weiteren stellt der Einsatz von Nahinfrarotlicht eine deutliche Verbesserung in Bezug auf die Verträglichkeit zu den bisher verwendeten Methoden wie Röntgen und CT dar. Es würde

somit die Strahlenbelastung nicht nur des einzelnen sondern auch die Strahlenbelastung durch die Medizin an sich sinken. Eine Dosis von 12 mSv für ein CT-Abdomen erhöht immerhin das Risiko der Tumorentstehung um 0,06 %. Statistisch verliert man damit 0,3 Tage seines Lebens bei jeder dieser CT-Untersuchungen. Des Weiteren kommt es bei einer solchen Untersuchung statistisch bei 4,8 von 100.000 Geburten zu einem genetischen Risiko von Fehlbildungen potentieller Nachkommen fertiler Patienten (Füller 2010). Auch dies würde durch Einsatz von Licht zur Diagnostik wegfallen.



## 5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbindung von Krebs und Entzündung.	4
Abbildung 2: Phagozyteninteraktion während einer Entzündung.	6
Abbildung 3: Diagramm über die Absorption von Hb, HbO <sub>2</sub> und Wasser bei verschiedenen Wellenlängen des Lichtes mit Darstellung des „NIR window“	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung von FRET am Beispiel von DY-682 und DY-782.	10
Abbildung 5: Chemische Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes DY-505 (freie Säure)	13
Abbildung 6: Chemische Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 (freie Säure)	14
Abbildung 7: Chemische Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes DY-782 (freie Säure)	14
Abbildung 8: Dargestellt sind die Excitations- und Emissionsspektren der beiden Farbstoffpaare DY-682/DY-782 (oben) und DY-505/DY-782 (unten).	16
Abbildung 9: Der Maestro <sup>TM</sup> -Kleintierimager.	21
Abbildung 10: Aufnahme von Makrophagen der Zelllinie J774 mittels Phasenkontrastmikroskop.	23
Abbildung 11: Abbildung einer NMRI-Maus.	24
Abbildung 12: Der für die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an die un-spezifischen IgG-Moleküle verwendete Schüttelinkubator der Arbeitsgemeinschaft für Experimentelle Radiologie.	28
Abbildung 13: Prinzip der Gelpermeationschromatographie.	29
Abbildung 14: Dargestellt ist eine Sephadexsäule während der Auftrennung des Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 in IgG-gekoppelten und freien Fluoreszenzfarbstoff.	30
Abbildung 15: Die für die Berechnungen der Konzentrationen A) von IgG und B) des Fluoreszenzfarbstoffes verwendeten mathematischen Formeln	32
Abbildung 16: Beispiel einer Spektrophotometerkurve für den Farbstoff DY-782 aufgenommen mittels der Wavescan-Software.	33
Abbildung 17: Schema der auf Nitrocellulosemembran aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoffe	34
Abbildung 18: Schema für die Auftragung der Fluoreszenzfarbstoffe auf die Nitrocellulosemembran für die Gegenüberstellung von IgG-gekoppeltem und freiem Fluoreszenzfarbstoff.	35
Abbildung 19: Schema für die Positionierung der Cups im Maestro <sup>TM</sup> -Kleintier-imager.	36

Abbildung 20: Abgebildet sind die mittels der Software Maestro 2.4.3 am Maestro-TM-Kleintierimagers bestimmten Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe DY-682 (Rot), DY-782 (Grün) und DY-505 (Blau).	39
Abbildung 21: Beispiel für die Weiterbearbeitung eines von einer Nitrozellulose-membran mittels Maestro <sup>TM</sup> -Kleintierimager gewonnenen Fluoreszenzbildes mit Hilfe der Maestro 2.4.3-Software.	40
Abbildung 22: Dargestellt sind verschiedene Zellkulturflaschen befüllt mit Makrophagen der Zelllinie J774 nach Passagieren.	43
Abbildung 23: Dargestellt ist das Schema für die Verteilung der inkubierten Zellen auf den Chamber Slides.	47
Abbildung 24: Schema für die Implantation der mit Fluoreszenzfarbstoff inkubierten Makrophagen in den Rücken der Versuchstiere.	49
Abbildung 25: Gegenüberstellung von FRET-Paar und Kontroll-Paar nach Vermessung auf Nitrozellulosemembran.	54
Abbildung 26: Vergleich der Ratio (Signalintensität im Paar / Signalintensität Allein) von FRET-Paar und Kontroll-Paar.	55
Abbildung 27: Vergleich der Signalstärke zwischen IgG-gekoppeltem und freiem Farbstoff.	57
Abbildung 28: Darstellung der Fluoreszenzintensitätsratio von IgG-gekoppeltem Farbstoff und freiem Farbstoff der beiden Fluorophore DY-682 und DY-782.	58
Abbildung 29: Darstellung des freien und des IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes DY-682 in verschiedenen Verdünnungen.	60
Abbildung 30: Darstellung der mit freiem Farbstoff inkubierten Makrophagen.	62
Abbildung 31: Graphische Darstellung der Signalintensität der freien Fluoreszenzfarbstoffe des FRET-Paares.	63
Abbildung 32: Graphische Darstellung der Signalintensität der freien Fluoreszenzfarbstoffe des Kontroll-Paares.	63
Abbildung 33: Darstellung der mit IgG-gekoppeltem Farbstoff inkubierten Makrophagen.	64
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Signalintensität der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe des FRET-Paares.	65
Abbildung 35: Graphische Darstellung der Signalintensität der IgG-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe des Kontroll-Paares.	65
Abbildung 36: Darstellung der intrazellulären Lokalisation des Fluoreszenz-farbstoffes DY-682 in inkubierten Makrophagen.	67

Abbildung 37: Fluoreszenz der Mäuse nach subcutan-Applikation von mit Fluoreszenzfarbstoff behandelten Makrophagen.	69
Abbildung 38: Semiquantitative Auswertung des Signalintensitätsverlaufes der Fluoreszenzsignale nach subcutaner Applikation der mit Fluoreszenzfarbstoff behandelten Makrophagen.	70
Abbildung 39: Ratio des Akzeptorverhaltens für das FRET-Paar und das Kontroll-Paar.	71
Abbildung 40: Darstellung der Fluoreszenz in post-mortem aus einer Kontroll-Paar-Maus heraus präparierten Zellpellets.	72
Abbildung 41: Darstellung der Fluoreszenzen in der FRET-Paar-Gruppe.	74
Abbildung 42: Darstellung der Fluoreszenzen in der Kontroll-Paar-Gruppe.	75
Abbildung 43: Semiquantitative Auswertung der Signalintensitäten für FRET- und Kontroll-Paar.	76
Abbildung 44: Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitätsratios (Signal im Paar / Signal Allein).	78
Abbildung 45: Der Prozess der Phagozytose.	83
Abbildung 46: Vergleich der mit gelbem Farbstoff gelabelten Lysosomen von MDCK-Zellen mit den CLSM-Bildern der mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-682 inkubierten Makrophagen dieser Arbeit.	84
Abbildung 47: Ein hypothetisches System mit mehreren Kameras, welches es ermöglichen würde die Eindringtiefe der Farbstoff optimal auszunutzen.	87
Abbildung 48: Untersuchungen zur Einwanderung von Polymorphonuclear leucocytes (PMN; polymorphkernige Leukozyten) in eine vorher induzierte Peritonitis.	91
Abbildung 49: Zeitlicher Ablauf der Einwanderung von Entzündungszellen in ein entzündliches Gewebe.	92
Abbildung 50: Schema zu den ablaufenden Prozessen nach intravenöser Applikation der Farbstoffsonden.	94
Abbildung 51: Gesamtschema von möglichen Wechselwirkungen zwischen NFkB und Entzündungssignalwegen bei der Entstehung und Progression von Neoplasien.	96
Abbildung 52: Schematische Darstellung des Leukotrienbiosyntheseweges	97
Abbildung 53: Schematische Darstellung der Internalisierung von verschiedenen Substanzen zur in die Zelle via Endozythose sowie eine zwischengeschaltete endosomalen Freisetzung.	98

### 6. Quellenverzeichnis

- Abdel-Latif MM. 2009. Inflammation and esophageal carcinogenesis. *Current Opinion in Pharmacology*, 9:396 - 404.
- Ajuebor MN. 1999. Regulation of Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  Expression and Function by Endogenous Interleukin-10 in a Model of Acute Inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255:279 - 282.
- CHARLES RIVER 11.03.2010 18:46. NMRI Mice  
<http://wwwcareers.crl.com/SiteCollectionDocuments/NMRI-MICE.pdf>.
- Choi SP. 2010. Protective Effects of Black Rice Bran against Chemically-Induced Inflammation of Mouse Skin. *J Agric Food Chem*, 58:10007 - 10015.
- Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420.
- CRI Inc. 30.06.2010 12:59. Nuance (TM) <http://www.cri-inc.com/products/nuance.asp>.
- Dyomics. 2007. DYOMICS Catalogue. 5. Aufl.
- Eisenblätter. 2009. In vivo optical imaging of cellular inflammatory response in granuloma formation using fluorescence-labeled macrophages. *Journal of Nuclear Medicine*, 50 (10).
- Fehr M, Frommer WB, Lalonde S. 2002. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *PNAS*, 99 (15):9846 - 9851.
- Förster T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Analen der Physik*, 6 (2).
- Füller J. 2010. Biologische Wirkungen ionisierender Strahlung (Teil 2)
- Funk. 2005. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nature Reviews*, 4.
- Hangauer MJ, Bertozzi CR. 2008. A FRET-Based Fluorogenic Phosphine for Live-Cell Imaging with the Staudinger Ligation. *Angew Chem Int*, 47:2394 - 2397.
- Hansch A, Frey O, Sauner D, Hilger I, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser W. 2004. In vivo imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence (NIRF). *Arthritis and Rheumatism*, 50:961 - 967.
- Herold G. 2009. Innere Medizin - Herold. Dr. med. Gerd Herold.
- Hoffman C. 2005. A FIAsH-based FRET approach to determine G-protein-coupled receptor activation in living cells. *Nature Methods*, 2 (3).

- Khor TO, Yu S, Kong A-N. 2008. Dietary Cancer Chemopreventive Agents - Targeting Inflammation and Nrf2 Signaling Pathway. *Planta Med*:1540 - 1547.
- Kohs J. 2008. In vivo imaging of the inflammatory receptor CD40 after cerebral ischemia using a fluorescent antibody. *Stroke*, 39:2845 - 2852.
- Kurnatowska I, Pawlikowski M. 2001. Anti-Inflammatory Effects of Somatostatin Analogs on Zymosan-Induced Earlobe Inflammation in Mice: Comparison with Dexametasone and Keopufen. *Neuroimmunomodulation*, 9:119 - 124.
- Lakowicz JR. 1999. *Prinziples of Fluorescence Spectroscopy*. Second Edition Aufl. New York: Kluwer academic / Plenum Publishers.
- Luge T. 2009. Charakterisierung eines FRET-Paares in vitro und Optimierung der Methode zum Nachweis von FRET-Effekten in der Molekularen Bildgebung Jena:
- Mahmood U, Weissleder R. 2003. Near-Infrared Optical Imaging of Proteases in Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2:489 - 496.
- Majdalawieh A, Ro H-S. 2010. Regulation of IkBa Function and NF-kB Signaling: AEBP1 is a Novel Proinflammatory Mediator in Macrophages. *Mediators of Inflammation*, Hindawi Publishing Corporation:27 pages.
- Pauli J, Vag T, Haag R, Spieles M, Wenzel M, Kaiser WA, Resch-Genger U, Hilger I. 2009. An in vitro characterisation study of new near infrared dyes for molecular imaging. *European Journal of Medical Chemistry*, 44:3496-3503.
- Porta C. 2009. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, 214:761 - 777.
- Ralph P, Moore M, Nilsson K. 1976. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *Journal of Experimental Medicine*, 143:1528-1533.
- Rao NL. 2007. Anti-Inflammatory Activity of a Potent, Selective Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitor in Comparison with the 5-Lipoxygenase Inhibitor Zileuton. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321:1154 - 1160.
- Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, Loetscher P, Wilkinson TS, Jones SA, Topley N. 2001. Differential Regulation of Chemokine Production in Human Peritoneal Mesothelial Cells: INF- $\gamma$  Controls Neutrophil Migration Across the Mesothelium In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 167:1028-1038.
- The Rosania Research Group 30.11.2010; 21:56. Chemical Address Tags <http://www-personal.umich.edu/~grosania/antiproliferatives.html>.

- Sayers TJ, Wilttrout TA, Bull CA, Denn AC, Pilaro AM, Lokesh B. 1988. Effect of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. *The Journal of Immunology*, 141 (5).
- Soehnlein O, Lindbom L. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10.
- Stockholm D. 2005. Imaging Calpain Protease Activity by Multiphoton FRET in Living Mice. *J Mol Biol*:215 - 222.
- Swanson JA. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature Reviews Molecular cell biology*, 9.
- Swanson JA, Hoppe AD. 2004. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 76.
- Tsien RY. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem*, 67:509 - 544.
- Underwood S, Foster M, Raeburn D, Bottoms S, Karlsson J-A. 1995. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness. *European Respiratory Journal*, 8:2104-2113.
- Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ. 2010. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*.
- Yamamoto S, Sugahara S, Ikeda K, Shimizu Y. 2006. Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 7A and -4 dual inhibitor, YM-393059, on acute and chronic inflammation models. *European Journal of Pharmacology*, 550:166 - 172.
- Zhang J, Chen L, Raina H, Blaustein MP, Wier WG. 2010. In vivo assessment of artery smooth muscle  $[Ca^{2+}]_i$  and MLCK activation in FRET-based biosensor mice. *Hearth and Circulatory Physiology*, 299:946-956.

### 7. Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen bedanken:

- Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger für die Bereitstellung des Themas, die fachkompetente Hilfe sowie die Geduld die sie mir und meiner Arbeit entgegen gebracht hat
- Dr. rer nat. Corinna Busch für die Anleitung, Ratschläge und die gute Betreuung während den Experimenten
- Dipl.-Biochem. Franziska Hamann für ein jederzeit offenes Ohr bei allen Fragen rund um den Maestro<sup>TM</sup>-Kleintierimager sowie die Dyomics Fluoreszenzfarbstoffe
- Dipl.-Biol. Christiane Geyer für die Hilfe bei den Experimenten und dem Umgang mit den NMRI-Mäusen
- MTRA Yvonne Heyne für die Anleitung zum Umgang mit den J774-Makrophagen
- der Firma Dyomics GmbH für die Bereitstellung der Fluorophore
- Susanne Kossatz für die Hilfe am CLSM sowie für ein stets offenes Ohr
- Antje Rothkegel für ihre seelisch-moralische Unterstützung sowie für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen
- und Last-But-Not-Least meinen Eltern Petra Schröter und Klaus Schröter für ihre kritischen Anmerkungen in Bezug auf die Arbeit, ihre Anteilnahme und natürlich für ihre finanzielle und materielle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

### **8. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Tom Schröter, dass mir die geltende Promotionsordnung der Friedrich-Schiller-Universität-Jena bekannt ist. Des Weiteren erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt habe und dabei keine Textabschnitte Dritter oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir verwendeten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in dieser Arbeit angegeben habe. Bei der Auswahl und Anfertigung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes wurde ich unterstützt durch Frau Dr. Busch sowie durch Frau Prof. Dr. Hilger. Ich habe für die Erstellung dieser Arbeit weder einen Promotionsberater zu Hilfe genommen noch haben andere unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der hier vorliegenden Dissertation stehen. Weder wurde diese Dissertation von mir als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht noch wurde sie selbst oder wesentliche Teile dieser Arbeit bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

---

Ort, Datum, Unterschrift



## 9. Tabellarischer Lebenslauf

### Allgemeine Angaben

Vorname: Tom  
Nachname: Schröter  
Anschrift: Am Schoßbach 10  
07552 Gera  
Telefon: 0176/78204224  
E-Mail: Tom.Schroeter@uni-jena.de  
Geburtsdatum: 30.03.1984  
Geburtsort: Gera  
Familienstand: ledig, keine Kinder

### Schulische Ausbildung

1990 – 1994 18. Grundschule, Gera  
1994 – 2002 Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium, Gera, Abitur

### Grundwehrdienst

2002 – 2003 Standort Sanitätszentrum Weißenfels; hier Ausbildung zum  
Sanitäter und Durchführung von Regeluntersuchungen

### Berufliche und wissenschaftliche Ausbildung

2003 – 2006 Ausbildung zum Krankenpfleger im SRH-Waldklinikum Gera  
Seit 2006 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
2010 Promotion, Thema: „Untersuchung eines FRET-Systems zur  
Darstellung von Entzündungsprozessen in vitro und in vivo  
mittels molekularer Bildgebung“

## TABELLARISCHER LEBENSLAUF

---

### **Famulaturen**

1. 23.02.09 – 22.03.09      SRH-Wald-Klinikum Gera, Zentrale Notaufnahme
2. 06/09 – 10/10              Forschungszentrum Lobeda, Universitätsklinikum Jena, AG  
Experimentelle Radiologie
3. 01.09.10 – 01.10.10      Kreiskrankenhaus Wolgast, Abteilung für Innere Medizin
4. 21.02.11 – 21.03.11      Vivantes Klinikum Prenzlauer Berg, Berlin

### **Sprachkenntnisse:**

Muttersprache:              Deutsch  
Fremdsprachen:            Englisch, Französisch

---

Ort, Datum, Unterschrift